

Université de Montréal

Association de tau avec les membranes Golgiennes :
nouvelles avenues dans la pathogenèse de tau

Par
Sébastien Perreault

Sciences neurologiques
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
pour de l'obtention du grade de

Maître en sciences (M.Sc.)
Sciences neurologiques

avril 2005

©, Sébastien Perreault, 2005



W

4

U58

2005

V.158

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Facultés des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Association de tau avec les membranes Golgiennes :
nouvelles avenues dans la pathogenèse de tau

présenté par :
Sébastien Perreault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Descarries
président-rapporteur

Dre Nicole Leclerc
directrice de recherche

Dr Louis Gaboury
membre du jury

Résumé

Tau est une protéine associée aux microtubules. Enrichie dans l'axone, elle stabilise et favorise la formation des microtubules lors de l'élongation axonale. Notre étude a permis de caractériser une nouvelle interaction de tau avec l'appareil de Golgi. Nous avons d'abord identifié cette association grâce à un fractionnement subcellulaire d'homogénats de cerveaux de rats. L'analyse biochimique des fractions montre une quantité importante de tau dans la fraction enrichie en protéines golgiennes, MG160 et Mannosidase II. Un double marquage à l'or de la protéine tau et des protéines golgiennes en microscopie électronique a confirmé l'association entre tau et les vésicules golgiennes. La technique de co-immunoprécipitation a également permis d'isoler un complexe protéique contenant la protéine MG160 et la protéine tau. D'autre part, une analyse en microscopie confocale de la distribution de tau et de MG160 dans des neurones hippocampaux en culture a révélé une colocalisation partielle de ces deux protéines en périphérie des membranes golgiennes. L'immunocytochimie à l'or a aussi confirmé la présence de tau sur les membranes golgiennes dans des neurones intacts de moelle épinière. Cette technique a révélé que la distribution de tau est polarisée au sein de l'appareil de Golgi et que la protéine est concentrée dans la partie trans de l'appareil de Golgi. Enfin, l'analyse biochimique suggère que la protéine de la fraction golgienne est phosphorylée, notamment aux sites reconnus par l'anticorps phosphodépendant PHF-1.

Mots clés : Tau, Appareil de Golgi, Polarité neuronale

Abstract

Tau is a microtubule-associated protein enriched in the axon and known to stabilize and promote the formation of microtubules during axonal elongation. In the present study, we characterized a new interaction of Tau with the Golgi apparatus. We first identified this association by subcellular fractionation of rat brain homogenate. The fraction enriched in markers of the medial Golgi compartment, MG160 and mannosidase II, presented a high Tau content. Double-immunogold labeling of Tau and Golgi proteins at the electron microscopic level demonstrated the association of Tau with Golgi vesicles in this fraction. By co-immunoprecipitation, we were able to isolate a Golgi protein complex containing MG160 and Tau. Furthermore, confocal microscopic analysis of the distribution of tau and MG160, in cultured hippocampal neurons, revealed that these two proteins were partially co-localized at the periphery of Golgi membranes. Electron microscopic immunogold labeling demonstrated the presence of Tau on the Golgi membranes in intact neurons of the spinal cord. Interestingly, this technique revealed a gradient in the association of Tau with Golgi membranes. Tau was found in all Golgi compartments but in higher concentration on the trans side of the Golgi. Finally, the pool of tau present in the Golgi subfraction was phosphorylated at sites recognized by the phosphorylation-sensitive antibody PHF-1.

Keywords: Tau, Golgi apparatus, Neuronal polarity

Table des matières

Résumé	III
Table des matières	V
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations	IX
Remerciements	XI
Chapitre premier	
Introduction et objectifs de travail	1
I La protéine tau	3
I. 1. Tau : du gène à la protéine	3
I. 2. Association de tau aux microtubules	4
I. 3. Phosphorylation de la protéine tau	7
I.4. Régulation de la fonction de tau par la phosphorylation	8
I.5. Kinases impliquées dans la phosphorylation de tau	9
I.6. Phosphatases impliquées dans la phosphorylation de tau	10
I.7. Autres modifications post-traductionnelles de la protéine tau	11
II Implication de tau dans la neurodégénérescence	11
II.1. Maladies neurodégénératives impliquant la protéine tau	11
II.2. Structure et formation des enchevêtrements neurofibrillaires de tau	13
II.3. Modèles animaux et implication de tau dans la neurodégénérescence	15
III Nouvelles avenues pour l'étude du rôle de tau dans les processus neurodégénératifs	18
III. 1. Nouvelles données sur la localisation de tau	18
III. 2. Remise en question de la fonction de tau et des hypothèses traditionnelles	19
III. 3. Autres associations et fonctions possibles de tau	21
IV Objectifs de travail: association de tau avec les membranes golgiennes.	24
Chapitre deuxième	
Article soumis au Journal of Neurochemistry	42
<i>Association of tau with the Golgi membranes :</i>	42
<i>a new key in tau function</i>	42
Abstract	44
Introduction	46
Materials and Methods	49
Results	54
Discussion	62
Acknowledgments	68
Bibliography	69
Table	73
Figures and legends	74

Chapitre troisième	
Discussion.....	92
I Fonction probable de l'interaction de tau et de l'appareil de Golgi	93
I.1 Maintien de la morphologie de l'appareil de Golgi	93
I.2 Implication de tau dans la polarité neuronale.....	95
II Nature de l'interaction entre la protéine tau et l'appareil de Golgi	97
II.1 La protéine tau associée à l'appareil de Golgi est phosphorylée	97
II.2 Complexes protéiques pouvant médier l'interaction de tau avec les membranes golgiennes.....	98
III Perturbation de l'association entre tau et l'appareil de Golgi et possible implication dans la neurodégénérescence.....	100
III.1 Altération de la distribution de la protéine tau	100
III.2 Altération de la structure de l'appareil de Golgi	101
III.3 Conséquences fonctionnelles de la perturbation de l'association de tau et de l'appareil de Golgi	104
IV Conclusion.....	106
Bibliographie	107
Annexe.....	i
Contribution personnelle	ii

Liste des tableaux

Chapitre premier

Tableau I.	Présence de tau dans différentes maladies.....	27
Tableau II.	Tableau des mutations du gène de tau.....	29

Chapitre deuxième

Table I.	Quantification of the number of gold particles associated with membranes in the I2 subfraction.....	73
----------	--	----

Liste des figures

Chapitre premier

Figure 1.	Représentation schématique d'un neurone.....	31
Figure 2.	Représentation des six isoformes de tau.....	33
Figure 3.	Phosphorylation de tau.....	35
Figure 4.	Implication de tau dans la neurodégénérescence.....	37
Figure 5.	Structure de l'appareil de Golgi.....	39

Chapitre deuxième

Figure 1.	Immunoblot analysis of adult rat brain subfractions.....	74
Figure 2.	Electron microscopy of the I2 subfraction.....	76
Figure 3.	Electron microscopic immunocytochemistry of tau in the I2 subfraction.....	78
Figure 4.	Co-immunoprecipitation of a Golgi protein complex containing MG160 with an anti-tau antibody.....	80
Figure 5.	A partial co-localization of tau and MG160 in primary hippocampal neurons.....	82
Figure 6.	Electron microscopic immunocytochemistry on the sections of the spinal cord showing tau staining on microtubules.....	84
Figure 7.	Electron microscopic immunocytochemistry on a section of a mouse spinal cord.....	86
Figure 8.	Quantitative analysis of tau immunogold on the GA membranes.....	88
Figure 9.	Immunoblot analysis of the phosphorylation state of tau in the I2 subfraction.....	90

Chapitre troisième

Figure 1.	Modèle de l'interaction tau-golgi.....	117
-----------	--	-----

Liste des abréviations

3R	« three repeats » trois séquences répétées dans le domaine carboxy-terminal
4R	« four repeats » quatre séquences répétées dans le domaine carboxy-terminal
APP	« amyloid precursor protein »
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
cAMP	« cyclique adénosine monophosphate »
<i>C.elegans</i>	« <i>Caenorhabditis elegans</i> »
C-terminal	séquence carboxy-terminale
CamPK II	« calmodulin protein kinase II Ca^{2+} »
Cdk2	« cyclin-dependent kinase 2 »
Cdk5	« cyclin-dependent kinase 5 »
E(x)	exon. Le chiffre correspond au numéro de l'exon
Eed	« embryonic ectoderm development »
FTDP-17	démence fronto-temporale avec parkinsonisme associée au chromosome 17
FTD	démence fronto-temporale
GAG	glycosaminoglycan
GSK3-β	« glycogen synthase kinase-3 Bêta »
IGF-1	« insulin growth factor-1 »
MAP	« mitogen activated protein »
MAPs	« microtubule associated proteins »
MAP2	« microtubule associated protein 2 »
MAP-1	« microtubule associated protein 1 »
MARK	« microtubules affinity-regulating kinase »
(x)N	insertion d'une séquence amino-terminale. Le chiffre correspond au nombre d'insertions

NFT	« neurofibrillary tangles »
N-terminal	séquence amino-terminale
PDPK	« proline directed protein kinase »
PAR-1	« proteinase-activated receptor-1 »
PHF	« paired helical filament »
Pin-1	« peptidyl-prolyl cis-trans isomerase protein »
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PP(x)	protéine phosphatase
R(x)	domaine de liaison. Le chiffre correspond au numéro du domaine
SAP	« stress activated protein »
Ser(x)	sérine. Le chiffre correspond à son emplacement dans la protéine
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
Thr(x)	thréonine. Le chiffre correspond à son emplacement dans la protéine

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Nicole Leclerc, qui a su, au cours des deux dernières années, me transmettre sa passion pour la recherche. Grâce à elle, j'ai eu la chance de participer à un projet extrêmement intéressant et de développer mes connaissances scientifiques. Sa rigueur, son accessibilité ainsi que son humour en font une directrice de recherche des plus appréciées et des plus compétentes. J'aimerais également remercier le Dr Jacques Paiement pour son aide et ses conseils scientifiques dans l'élaboration des projets de recherche. Le soutien et l'enseignement de mes collègues de laboratoire ont été d'une aide inestimable. Je tiens à remercier particulièrement Carole Abi Farah, Dalinda Liazoghli, Mylène Desjardins, Angela Anton ainsi que Marilyse Piché. Je remercie également deux nouveaux collègues dans notre laboratoire Vibol Ing et Olivier Bousquet. Ce projet de recherche n'aurait probablement jamais été complété sans le soutien inestimable de Michel Lauzon, qui m'a enseigné la microscopie et aidé à plusieurs niveaux. Je tiens également à remercier mes parents, Benoit Perreault et Francine Lavoie, pour le soutien qu'ils m'ont offert au cours de la maîtrise, mais également au cours des nombreuses années d'étude. Ils m'ont encouragé à persévérer et à relever les défis. Finalement, j'aimerais remercier ma fiancée, Emmanuelle Duquette, qui a partagé avec moi les quelques moments plus difficiles, mais également les moments enlevants. Elle a toujours su trouver les mots justes pour m'encourager.

Encore une fois, merci

Sébastien Perreault

Chapitre premier

Introduction et objectifs de travail

Les neurones sont les cellules les plus étudiées du système nerveux. Responsables de la transmission et de la transduction des signaux, les neurones comprennent deux régions cellulaires distinctes : un compartiment axonal et un compartiment dendritique. Alors que l'axone est un prolongement long et étroit, les dendrites sont plutôt courtes et présentent un diamètre plus important (**Figure 1**). Mis à part leur morphologie et leurs fonctions, ces deux types de neurites se distinguent par leur composition protéique. En effet, la protéine MAP2 est concentrée dans les dendrites et la protéine tau est plutôt enrichie dans l'axone. Ces deux protéines de la famille des MAPs (microtubules associated proteins) stabilisent les microtubules et contribuent à leur polymérisation et leur élongation. Une fois établi, le réseau microtubulaire participe au maintien de la morphologie cellulaire, au transport intracellulaire, ainsi qu'à la croissance neuritique. Compte tenu de l'importance des microtubules dans le fonctionnement neuronal, l'étroite relation entre les MAPs et les microtubules joue un rôle essentiel à cet égard. Dans certaines conditions neurodégénératives, ce fragile équilibre semble être perturbé. En effet, par suite de modifications structurales, tau se détacherait des microtubules et entraînerait l'effondrement du réseau microtubulaire axonal. La protéine tau hyperphosphorylée s'accumulerait alors dans le compartiment somato-dendritique pour former des filaments insolubles. Cette hypothèse présente cependant de nombreuses lacunes et ne tient pas compte de plusieurs découvertes récentes. Aujourd'hui, des études démontrent en effet que tau interagit non seulement avec les microtubules, mais également avec plusieurs autres protéines et éléments cellulaires. Dans le présent travail, nous rapportons une nouvelle

association inédite entre la protéine tau et l'appareil de Golgi. En raison de sa nature et de sa localisation, cette association pourrait jouer un rôle important. Cette découverte combinée aux récentes données sur la protéine tau ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de la fonction de tau et son rôle dans les états neurodégénératifs.

I La protéine tau

I. 1. Tau : du gène à la protéine

Présente en faible quantité dans les astrocytes et les oligodendrocytes, tau est une protéine essentiellement retrouvée dans les neurones du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) (Binder et al., 1985). Identifiée pour la première fois au milieu des années 70 dans une préparation de microtubules neuronaux, la protéine tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs) (Cleveland et al., 1977). Contrairement aux autres MAPs, les études de localisation ont révélé que tau est enrichie dans l'axone des neurones (Binder et al. 1985).

Le gène qui code pour la protéine tau est situé sur le chromosome 17q21 et se compose de 16 exons. L'épissage alternatif des exons E2, E3 et E10, six isoformes de tau composées de 352 à 441 acides aminés sont exprimées dans le cerveau humain. Trois de ces isoformes contiennent tantôt 3 séquences répétées carboxy-terminales (3R), tantôt 4 séquences répétées (4R) encodées par les exons E9, E10, E11 et E12 (Goedert et al., 1989). De plus, par suite de l'épissage alternatif des exons E2 et E3, les formes 3R et 4R de tau peuvent contenir aucune

insertions d'une séquence amino-terminale (N-terminale) (0N) ou en posséder une (1N) voir deux (2N) (Goedert et al., 1989) (**Figure 2**).

Le système nerveux périphérique, comporte une isoforme supplémentaire de haut poids moléculaire résultant de l'inclusion de l'exon E4a, appelée « Big Tau » (Goedert et al., 1992a). Enfin, on a identifié dans l'intron encadré par les exons 9 et 10 un gène codant pour une protéine de 128 acides aminés, nommée saithoine. (Conrad et al., 2002).

Fait intéressant, l'expression du gène de tau subit une régulation spatio-temporelle. En effet, seule l'isoforme la plus courte (3R/0N) se retrouve dans le cerveau fœtal. Rapidement après la naissance, les cinq autres isoformes s'expriment à leur tour pour créer un équilibre physiologique entre les formes 3R et 4R. (Goedert et al., 1989; Kosik et al., 1989)

Les études ultra-structurales de concert avec les données hydrodynamiques (Cleveland et al. 1977, Hirokawa et al. 1988) relèvent que la protéine tau adopte une forme linéaire « rod like » dépourvue de structure secondaire. Cette conformation sans repliement lui confère une certaine flexibilité et élasticité.

À l'échelon moléculaire, la protéine tau comprend 2 domaines : un domaine de liaison aux microtubules à l'extrémité C-terminal et un domaine de projection à l'extrémité opposée (N-terminal) qui projette à la surface des microtubules. Chacune de ces régions joue un rôle précis dans la fonction de tau.

I. 2. Association de tau aux microtubules

La co-purification des protéines tau et tubuline a grandement influencé les recherches sur la fonction de tau. En effet, on a voulu comprendre pourquoi et

comment tau liait les microtubules. Ces derniers sont des éléments du cytosquelette formés de 13 protofilaments composés de deux sous-unités de tubuline α et β . Présents dans tous les compartiments neuronaux, les microtubules sont responsables de la croissance neuritique et du transport des vésicules membranaires. C'est en effet à la surface des microtubules que les protéines motrices kinésines et dynéines se déplacent pour assurer le transport des différents constituants membranaires. Cependant, en raison de leur fragilité, les microtubules doivent être stabilisés par une série de protéines pour préserver leur structure et leur fonction. Dans l'axone, les microtubules forment un réseau dense et parallèle grâce à l'action stabilisatrice de tau. Cette association implique 3 ou 4 séquences hautement conservées de 18 acides aminés chacun de la région C-terminale (Lee et al., 1989). Les 3 ou 4 domaines de liaisons aux microtubules sont par ailleurs espacés par une séquence de 13 à 14 acides aminés, région « inter-repeat », capable de moduler l'interaction de tau avec les microtubules (Himmler et al., 1989; Butner and Kirschner, 1991). Lors de l'élongation des microtubules, la liaison de tau se fait à la face interne du protofilament de tubuline β puis à l'extérieur une fois la polymérisation complétée. (Kar et al. 2003).

Tau induit la formation des microtubules. En effet, il a été démontré *in vitro* que l'addition de tau aux deux polypeptides de tubulines α et β assure la polymérisation et l'élongation de microtubules (Weingarten et al., 1975). D'autres parts, lorsque la protéine tau est transfectée dans des cellules non-neurales, elle favorise la formation de faisceaux de microtubules compacts caractéristiques des neurones (Kanai et al., 1992). Cette observation suggère qu'en plus de contribuer

à leur polymérisation, tau stabilise les microtubules en établissant des ponts entre les protofilaments. Il a d'ailleurs été démontré que la suppression de l'expression de tau diminue la quantité de microtubules stables dans les cultures primaires de neurones (Caceres et al., 1991). De plus, l'injection de la protéine tau dans des fibroblastes qui en sont normalement dépourvus protège les microtubules contre l'effet dépolymérisateur du nocodazole (Drubin et al., 1986). Des études in vitro ont révélé que toutes les isoformes de tau n'exercent pas le même effet stabilisateur. En effet, les formes 4R de tau stabilisent plus efficacement les microtubules que les formes 3R car elles possèdent une région unique entre les domaines de liaison R1 et R2 qui facilite cette fonction (Goedert and Jakes, 1990). Cette différence d'affinité et de liaison est très importante au cours du développement. En effet, l'expression d'une isoforme de plus faible affinité pour les microtubules, (3R/0N), permet une plus grande flexibilité et confère aux microtubules le dynamisme nécessaire pour assurer la migration et l'élaboration des projections neuronales. Une fois le réseau établi, l'expression des formes 4R vient solidifier les structures microtubulaires existantes.

En plus de jouer un rôle dans la stabilisation et la polymérisation des microtubules, tau participe également à l'établissement de la polarité neuronale. En effet, dans les neurones en culture où l'on supprime l'expression de tau, on remarque une inhibition spécifique du développement axonal alors que les prolongements dendritiques sont toujours présents. (Caceres and Kosik, 1990).

La partie N-terminale de la protéine tau joue également un rôle important. Ce domaine de projection détermine l'espacement entre les microtubules et

augmente le diamètre axonal (J. Chen et al., 1992). D'autre part, plusieurs autres interactions protéiques et membranaires intéressent ce domaine N-terminal.

Finalement, sans participer directement aux interactions, la partie centrale de la protéine tau, riche en proline, se prête à des modifications post-traductionnelles capables de moduler les interactions de la protéine.

I. 3. Phosphorylation de la protéine tau

Les études d'immuno-détection ont révélé la phosphorylation d'une trentaine de sites (sur une possibilité de 79) de la plus longue isoforme de tau. **(Figure 3)** (Billingsley et Kincaid 1997). La phosphorylation séquentielle de ces sites suit un ordre bien établi. En effet, la phosphorylation préalable de certains résidues permet d'exposer d'autres sous-domaines qui deviendront à leur tour la cible de phosphorylation (Carmel et al., 1996; Jicha et al., 1997). En outre, plusieurs indices laissent croire que la phosphorylation procède selon une séquence spatio-temporelle précise. Au cours du développement, la phosphorylation de tau varie selon le degré de maturation des neurones du SNC. L'isoforme 3R0N, présente lors de la vie fœtale, constitue la forme la plus phosphorylée (Kennessey et Yen, 1993). Cette observation souligne l'importance des modifications post-traductionnelles de tau dans le développement embryonnaire des neurones. Tôt après la naissance, les autres isoformes font leur apparition et le degré de phosphorylation diminue. Après avoir atteint un plateau au cours de la vie adulte, la phosphorylation des six isoformes diminue de nouveau

lors du vieillissement par suite de l'activation de phosphatases. (Mawal-Dewan et al., 1994)

I.4. Régulation de la fonction de tau par la phosphorylation

À ce jour, la plupart des travaux examinant l'effet de la phosphorylation sur la fonction de tau se sont penchés sur la modulation de l'interaction entre tau et les microtubules. Il semble que la phosphorylation de certains sites spécifiques diminue l'affinité de liaison de tau en vers les microtubules et entrave leur polymérisation in vitro. Parmi ces sites clés, on retrouve les résidus de sérine, Ser 202, 214, 262, 324, 356, et de threonine, Thr205. Ceux-ci sont regroupés dans les régions adjacentes aux domaines de liaison aux microtubules (Bramblett et al., 1993; Brandt and Lee, 1993). Deux sites de phosphorylation, soit la Ser262 et la Ser396, conditionnent particulièrement la liaison de tau aux microtubules (Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993). Selon l'état de phosphorylation, l'affinité de tau pour les microtubules varie sensiblement. Les microtubules, une fois stabilisés, pourraient permettre au neurone d'échafauder son cytosquelette en fonction des besoins de la cellule. Le contrôle de la phosphorylation s'avère donc d'une importance capitale. Il est d'ailleurs régi par un grand nombre de protéines.

Par ailleurs, d'autres études ont rapporté que la phosphorylation de tau peut en modifier la dégradation. En effet, en plus d'affecter la liaison de tau aux microtubules, la phosphorylation par les kinases PKA et PKC prévient la dégradation de tau (Wang et al., 1996). La PKA phosphoryle la partie C-terminale

qui est nécessaire à la dégradation de la protéine tau par les caspases, la calpaïne, les enzymes lysosomiales et le protéasome.

I.5. Kinases impliquées dans la phosphorylation de tau

Comme la protéine tau est hyperphosphorylée dans plusieurs maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer, plusieurs groupes de recherche ont voulu identifier quelles kinases étaient impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau. La plupart des protéines kinases identifiées sont des protéines PDPK (Proline-Directed Protein Kinase). Parmi celles-ci, on retrouve la protéine kinase MAP, la kinase tau-tubuline, GSK-3 β , cdk2 et cdk5, la kinase PAR-1 et finalement, les SAP kinases. D'autres kinases n'exercent aucun effet contre les prolines. Celles-ci comprennent notamment la kinase régulant l'affinité aux microtubules (MARK), la protéine kinase cAMP-dépendant (PKA), la protéine kinase II Ca²⁺/calmoduline (CaMPK II) ainsi que la kinase caséine I et II (Baudier and Cole 1987; Hanger et al., 1992; Litersky and Johnson 1992; Mandelkow et al., 1992; Bauman et al., 1993).

Cependant, même si ces kinases phosphorylent tau in vitro, l'importance de celles-ci reste à être démontrée dans le cerveau humain. À ce jour, deux protéines kinases ont retenu l'attention en raison de leur implication potentielle in vivo: GSK-3 β et cdk5. (Lovestone et al., 1996). Selon ces études, l'inhibition de GSK-3 β via la cascade de signalisation des facteurs de croissance IGF-1 et de l'insuline, ainsi que son inhibition directe par le lithium, réduisent la phosphorylation de tau (Hong and Lee 1997; Hong et al 1997). Cdk5 contribue

également de façon significative à la phosphorylation de tau (Baumann et al., 1993). Enrichie dans les neurones, cette kinase lie la sous-unité p35 (Tsai et al., 1994; Sobue et al., 2000). La formation de ce complexe entraîne l'attachement de cdk5 aux microtubules et la phosphorylation de tau. Plus récemment, un groupe de chercheurs a rapporté que PAR-1 participe à la séquence de phosphorylation de tau (Nishimura et al. 2004). En effet, PAR-1 phosphoryle les résidus Ser262 et Ser356 de la protéine tau et favorise sa phosphorylation subséquente par les kinases cdk5 et GSK-3 β .

I.6. Phosphatases impliquées dans la phosphorylation de tau

Les protéines phosphatases sont des métalloenzymes qui catalysent la déphosphorylation des protéines. Les phosphatases contrôlent la phosphorylation de la protéine tau en contrebalançant l'effet des kinases. Parmi celles-là, on retrouve dans le SNC les protéines phosphatases (PP): PP1, PP2A, PP2B (calcineurine), PP4, PP5, PP6, PP7, et la PP2C. PP2A joue un rôle majeure car elle possède la capacité de déphosphoryler les sites clés régulant l'association de tau aux microtubules (Goedert et al., 1992b). Dans les neurones en cultures, l'inhibition de PP1 et PP2A par l'acide okadaïque augmente la phosphorylation de tau, entraînant une diminution de sa liaison aux microtubules et une rétraction de l'axone (Merrick et al., 1997).

I.7. Autres modifications post-traductionnelles de la protéine tau

Outre la phosphorylation, la protéine tau peut subir une série de modifications post-traductionnelles susceptibles d'en moduler la fonction. La protéine tau peut être notamment O-glycosylée sur les résidus sérine et thréonine (Lefebvre et al., 2003). Le rôle exact de l'addition de N-acétylglucosamine demeure inconnu, mais selon plusieurs études, il contrebalance l'effet de la phosphorylation et pourrait même modifier la distribution et la dégradation de tau (Arnold et al., 1996).

La protéine tau peut également être oxydée, ubiquitinée, glyquée, tronquée voir désaminée (Buée et al., 2000). Sans être entièrement connu, l'impact de ces modifications post-traductionnelles est susceptible de modifier la structure et la fonction de tau.

II Implication de tau dans la neurodégénérescence

II.1. Maladies neurodégénératives impliquant la protéine tau

Plusieurs maladies neurodégénératives se caractérisent par l'accumulation et l'agrégation de protéine dans la cellule. Dans la maladie d'Alzheimer, deux anomalies caractéristiques au plan neuropathologique ont été identifiées dès le début du 20^{ième} siècle : les enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) intracellulaires et les dépôts de β -amyloïde extracellulaires. L'analyse immunocytochimique et la spectroscopie de masse ont par la suite révélé que les NFTs se composent d'agrégats de protéine tau hyperphosphorylée (Goedert et al., 1988; Wischik et al. 1988). Malgré de légères différences à l'échelon structural,

les filaments formés de protéine tau s'observent aussi dans plusieurs autres maladies neurodégénératives (Buée et al., 2000). En raison de leurs caractéristiques pathologiques, les maladies où l'on retrouve des accumulations de tau sous forme de NFTs sont désignées sous le nom de tauopathologies. Cette famille de maladies comprend, outre la maladie d'Alzheimer, un sous-groupe appelé démences fronto-temporales. On connaît, à présent, quatre de ces démences : la démence fronto-temporale avec parkinsonisme associée au chromosome 17(FTDP-17), la dégénérescence cortico-basale (CBD), la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et la maladie de Pick. (**Tableau I**). Encore inconnues il y a une quinzaine d'année, ces maladies se caractérisent par la présence d'agrégats et l'absence de dépôts de β -amyloïde. Chacune de ces démences fronto-temporales affecte des régions spécifiques du SNC, mais toutes présentent des accumulations de tau hyperphosphorylée dans les corps cellulaires neuronaux ainsi qu'une mort neuronale importante (Buée et al., 2000; Lee et al. 2001). Des agrégats de protéine tau accompagnent les changements présents dans d'autres maladies neurodégénératives (**Tableau I**) (Buée et al., 2000).

L'existence de NFTs dans les démences fronto-temporales suggère qu'une dysfonction de la protéine tau entraîne la mort neuronale. D'ailleurs, le degré de la démence s'explique généralement par le degré d'accumulation et la distribution des NFTs et non par les dépôts de β -amyloïde (Holzer et al., 1994). L'identification de mutations dans le gène qui code pour la protéine tau chez les patients souffrant d'une FTD suggère qu'une anomalie de la protéine induit une dysfonction neuronale. On compte une vingtaine de mutations dans le gène

encodant la protéine tau (**Tableau II**). Certaines mutations nonsens peuvent affecter la séquence codante du gène et altérer la structure de la protéine entraînant une perte de fonction et un défaut de polymérisation des microtubules (Lee et al., 2001). Les mutations introniques peuvent altérer l'épissage alternatif de l'exon 10 et perturber l'équilibre des isoformes 3R et 4R (Hutton et al 1998). Ces mutations favorisent l'expression préférentielle d'un type d'une isoforme de tau et altèrent le fonctionnement normal de la protéine.

II.2. Structure et formation des enchevêtrements neurofibrillaires de tau

Les NFTs sont l'élément neuropathologique caractéristiques des tauopathologies. En raison de leur rôle éventuel dans les processus neurodégénératifs, beaucoup d'efforts ont été consentis pour en déterminer la structure et élucider les mécanismes cellulaires responsables de leur formation.

Les NFTs sont formés en majeure partie de protéines microtubulaires et d'agrégats de tau hyperphosphorylée. À l'échelon ultra-structural, ceux-ci se composent des filaments hélicoïdaux pairés (PHFs) et des filaments droits. (Kidd, 1963). Les PHFs sont constitués par l'enroulement de deux brins de 8 à 20 nm d'épaisseur ayant une périodicité de 80nm alors que les filaments droits ne montrent pas cet arrangement hélicoïdal.

Malgré une connaissance approfondie de l'ultrastructure des agrégats de tau, les mécanismes exacts impliqués dans la formation de ces filaments demeurent inconnus. La conformation de la protéine tau contribue certainement à son agrégation, puisque la protéine s'agglutine lorsqu'elle est en solution

(Crowther et al., 1994). D'autres modifications post-traductionnelles sont cependant nécessaires à la formation des NFTs. L'hypothèse la plus souvent évoquée soutient que la perturbation des mécanismes de régulation de la phosphorylation entraîne l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Ce processus induirait son détachement des microtubules, créant ainsi une grande quantité de tau hyperphosphorylée « libre » (Buée Sherrer et al., 1996; Liu and Yen, 1996; Trojanowski and Lee, 1995). Une fois redistribuée vers le compartiment somato-dendritique, elle formerait des agrégats (Mandelkow et al., 1998) (**Figure 4**). Compte tenu des similitudes entre l'état de phosphorylation de la protéine tau embryonnaire et celui retrouvé en condition pathologique, plusieurs chercheurs croient qu'il pourrait s'agir d'une réactivation des voies de signalisation observées normalement dans les neurones immatures. Cette hypothèse a récemment été étayée par l'association de la protéine mitotique Pin-1 aux filaments insolubles formés par tau dans les neurones qui dégénèrent (Lu et al., 1999; Thorpe et al., 2001).

La synthèse in vitro de filaments a fourni au cours des dernières années des informations intéressantes sur la formation des NFTs. Goeder et al. (1996) ont tout d'abord réussi à induire la formation de NFTs en utilisant des glycosaminoglycans sulfatés (GAGs). Ces molécules stimulent la phosphorylation de la protéine et favorisent la formation d'agrégats. Des études ultérieures ont montré que l'ARN et l'acide arachidonique peuvent également induire la formation de filaments (Kampers et al., 1996; Wilson and Binder, 1997). La co-localisation de GAGs et d'ARN avec la protéine tau hyperphosphorylée in vivo laisse croire que ces

molécules peuvent effectivement être impliquées in vivo dans la formation de PHFs (Goedert et al., 1996; Verbeek et al., 1999). Von Bergen et al. (2000) ont par ailleurs rapporté que la présence d'une courte séquence d'acides aminés dans la troisième répétition du domaine de liaison aux microtubules est essentielles à la formation de filaments. Les études in vitro ont également permis d'établir que les isoformes 3R seraient responsables de la formation des PHFs, alors que les isoformes 4R formeraient les filaments droits (Goedert et al., 1996).

D'autres modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination, l'oxydation, la glycation et des co-facteurs tels que l'apolipoprotéine E, les glycosaminoglycans et les polyanions (ARN) semblent donc participer à la formation de NFTs (Lee et al., 2001). Par ailleurs, les mutations de tau peuvent aussi contribuer à la formation d'agrégats. En effet, ces mutations modifient la structure de la protéine et favorisent la formation de NFTs (Goedert et al., 1998; Ingram and Spillantini, 2002).

II.3. Modèles animaux et implication de tau dans la neurodégénérescence

Même si tau semble jouer un rôle dans la neurodégénérescence, les mécanismes intracellulaires entraînant la mort neuronale demeurent encore inconnus. Certains chercheurs prétendent que les NFTs sont responsables de la neurodégénérescence, alors que d'autres affirment que l'hyperphosphorylation de la protéine tau est suffisante pour induire la mort cellulaire. Puisque l'analyse des tissus humains post-mortem et les études in vitro comportent toutes deux des limites, des modèles d'animaux transgéniques ont récemment été développés.

Grâce eux, il est maintenant possible de suivre l'évolution temporelle de la protéine tau lors du processus neurodégénératif.

Par suite à l'identification de mutations responsables des FTDs, plusieurs lignées de souris transgéniques surexprimant les formes mutantes de la protéine tau humaine R406W, V337M, G272V, P301S, ainsi que P301L, ont été produites. Chez ces souris transgéniques, on retrouve des agrégats de la protéine tau mutée dans le corps cellulaire des neurones ainsi qu'une perte neuronale importante. Ces modèles animaux présentent un phénotype sévère et montrent souvent des signes de neurodégénérescence importants au cours des six premiers mois de la vie. Les souris qui expriment les mutations R406W et V337M montrent notamment une atteinte des neurones de l'hippocampe accompagnée de troubles comportementaux et moteurs qui rappellent les symptômes observés chez les patients atteints de tauopathologies (Tanemura et al., 2001; Tatebayashi et al., 2002;). Chez les souris transgéniques P301L, on retrouve une gliose importante et des enchevêtrements neurofibrillaires dans les motoneurones de la moelle épinière. Comme cette mutation favorise l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine tau, elle pourrait induire la formation de NFTS (Lewis et al., 2000).

Récemment, une lignée de souris transgéniques exprimant les 6 isoformes de la protéine humaine tau non mutée a été produite. Ces souris présentent également des agrégats de tau hyperphosphorylée, mais développent un phénotype beaucoup moins sévère et d'apparition tardive (Andofer et al. 2003). D'autres souris transgéniques surexprimant les isoformes de la protéine tau humaine non-mutante montrent également des atteintes neuronales en absence d'agrégats. Chez

les souris transgéniques qui surexpriment la protéine tau humaine 4R, la protéine est phosphorylée sur les sites associés aux tauopathologies et s'accumule dans le compartiment somato-dendritique. Malgré des problèmes moteurs et sensoriels dûs à une dégénérescence axonale de la moelle épinière et du cortex cérébral, il n'y a pas chez ces souris ni de mort cellulaire ni d'agrégats de tau hyperphosphorylée (Götz et al., 1995; Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000). Les souris surexprimant la protéine tau humaine 3R ressemblent aux souris transgéniques 4R. En effet, la protéine tau 3R s'accumule dans les soma-dendrites engendrant une atteinte neurologique en l'absence d'agrégats. Lorsque la protéine 3R est surexprimée de 5 à 15 fois par rapport au niveau endogène, la protéine tau hyperphosphorylée devient insoluble, mais sans former de structures similaires aux NFTs (Brion et al., 1999; Ishihara et al., 1999).

Chez la drosophile exprimant une forme mutante de tau (R406W), on observe une hyperphosphorylation de la protéine tau et une mort neuronale importante en l'absence d'enchevêtrements (Wittman et al., 2001). Cette observation fait écho aux nombreuses controverses concernant l'implication des NFTs dans la physiopathologie des tauopathologies. Le processus neurogénératif pourrait être enclenché bien avant l'apparition des NFTs. Cette hypothèse a été confirmée chez le ver *C. elegans* (Goedert, 2003). Dans ce modèle de tauopathie, l'expression des formes mutantes de tau humaine P301L et V337M entraîne l'accumulation de protéine tau humaine hyperphosphorylée dans le compartiment somato-dendritique. Ces vers transgéniques développent alors des

troubles de coordination et présentent de la mort neuronale avant même l'accumulation de tau insoluble.

Bien qu'il s'agisse de modèles animaux, ces études tentent à démontrer que l'accumulation somato-dendritique de la protéine tau hyperphosphorylée est suffisante pour induire la neurodégénérescence. Les NFTs qui apparaissent par la suite exacerberaient le processus conduisant à la mort neuronale.

Plus récemment, des modèles d'animaux transgéniques ont permis d'étudier l'implication des kinases dans la pathogenèse de tau. Lorsque GSK-3 β est surexprimée chez la mouche ou cdk5 chez la souris, la protéine tau devient hyperphosphorylée et forme des agrégats de type NFTs (Jackson et al., 2002). Récemment, Cruz et al. (2003) ont rapporté que la surexpression de l'activateur de cdk5, p25, induit également la formation de NFTs chez la souris. Bien qu'encore imparfaits, ces modèles animaux permettront certainement de mieux comprendre les processus neuropathologiques responsables de la mort neuronale.

III Nouvelles avenues pour l'étude du rôle de tau dans les processus neurodégénératifs.

III. 1. Nouvelles données sur la localisation de tau

Contrairement aux premières observations qui suggéraient que tau était exclusivement axonale (Binder et al., 1985), des études plus récentes confirment sa présence dans le compartiment somato-dendritique. L'utilisation d'anticorps comme TAU-1, qui ne reconnaît qu'une sous-population de la protéine aurait

contribué à la propagation de cette idée préconçue. Cet anticorps ne détecte, en effet, que les isoformes déphosphorylées de la protéine tau. Par la suite, il a été démontré qu'après un traitement aux phosphatases, le marquage de tau est également retrouvé dans le corps cellulaire et les dendrites (Papasozomenos et al., 1997). De plus, certains anticorps qui reconnaissent des formes phosphorylées de tau, tel que AT8, PHF-1 et Alz-50 démontrent une distribution somato-dendritique de la protéine (Hamre et al., 1989).

En dépit de la controverse qu'elles soulèvent, les études du laboratoire de Binder ont montré que la protéine tau est également située dans le noyau des neurones. Ces chercheurs ont en effet identifié une forme hautement insoluble de tau dans la région organisatrice nucléaire (NORs) du chromosome acrocentrique (Loomis et al., 1990; Brady et al., 1995). Cette observation expliquerait la découverte de PHFs de tau en position périnucléaire et intranucléaire dans certaines conditions pathologiques (Metuzals et al., 1988)

Tau ne semble donc pas confinée au compartiment axonal comme on l'avait cru initialement. Sa distribution est ubiquitaire et semble varier en fonction de l'état de phosphorylation de la protéine. Cette hypothèse souligne le caractère unique et fonctionnel des différentes isoformes, ainsi que l'importance des modifications post-traductionnelles de tau.

III. 2. Remise en question de la fonction de tau et des hypothèses traditionnelles

Plusieurs théories cherchant à expliquer le rôle de la protéine tau dans les processus neurodégénératifs suggèrent que l'hyperphosphorylation de la protéine

perturbe son association aux microtubules. Cette perte d'interaction serait alors responsable de l'effondrement du réseau microtubulaire et de la formation des agrégats de tau hyperphosphorylée.

Malgré sa contribution, l'hyperphosphorylation de tau ne suffit pas à expliquer son détachement complet des microtubules tau *in vivo* (Seubert et al., 1995). Ce phénomène n'est d'ailleurs pas observé dans les neurones embryonnaires, même si le niveau de tau phosphorylée est similaire à celui observé en condition pathologique et où le site Ser262 est phosphorylé (Matsuo et al., 1994; Mawal-Dewan et al., 1994). De plus, les sites de phosphorylation de tau que l'on croyait tout d'abord spécifiques à la maladie d'Alzheimer sont également phosphorylés dans les neurones fœtaux et même chez l'adulte (Garver et al., 1994). Par contre, il semble que les biopsies obtenues chez les sujets témoins montrent une rapide déphosphorylation de la tau neuronale, laissant croire à un faible degré de phosphorylation. L'inhibition par des phosphatases a montré que plusieurs sites sont en réalité phosphorylés en condition physiologique (Garver et al., 1994).

D'autre part, certaines observations suggèrent que l'implication de tau lors de processus neurodégénératifs n'est pas secondaire à une déstabilisation des microtubules. En effet, les modèles cellulaires et animaux où l'on a induit une suppression de la protéine tau ne présentent pas une réorganisation majeure du réseau microtubulaire axonal. Même si le diamètre des petits axones est légèrement diminué, les neurones ne montrent pas d'anomalie majeure de la structure des microtubules (Harada et al., 1994). Cependant, malgré un réseau

cytosquelettique apparemment intact, les souris « knockout » pour tau présentent des troubles de comportement et une faiblesse musculaire suggérant que d'autres mécanismes cellulaires participent au processus pathologique (Ikegami et al., 2000). Par ailleurs, même en l'absence de tau, les neurones développent un axone lorsqu'ils se différencient en présence de laminine *in vitro*. Cette molécule extracellulaire induit une stimulation rapide et sélective de l'axone (DiTella et al., 1994). Par suite de ces observations étonnantes, il a été suggéré que la perte de la protéine tau est contrebalancée par la présence des autres MAPs. En effet, il semble que des protéines comme MAP-1 puissent également stabiliser les microtubules et participer à la croissance axonale (Garcia Rocha and Avila, 1995).

Dans les neurones *in vitro*, l'analyse de la distribution intra-axonale révèle que tau est enrichie dans la partie distale de l'axone. En effet, la protéine tau montre une co-localisation avec les microtubules tyrosinilés dans le cône de croissance (DiTella et al., 1994). Ces microtubules très dynamiques permettent le déplacement et l'élongation axonale. Ainsi, la protéine tau est associée aux microtubules les plus instables du compartiment axonal. Cette constatation paradoxale remet en question la fonction stabilisatrice de tau.

III. 3. Autres associations et fonctions possibles de tau

Alors qu'il a été démontré que la partie C-terminale de la protéine se lie aux microtubules et contribue à la polymérisation de ceux-ci, la partie N-terminale, elle aussi sujette à l'épissage alternatif, peut jouer un rôle important dans la fonction de tau. En effet, lorsque la protéine tau est associée aux

microtubules, ce domaine émet un prolongement de 19 nm à la surface des microtubules et interagit avec d'autres éléments cellulaires (Hirokawa et al. 1988).

Brandt et al. (1995) ont d'ailleurs rapporté que tau interagit avec la membrane plasmique via le domaine de projection dans les cellules PC12. Au cours du développement, cette interaction contribue à l'élaboration des prolongements axonaux. L'association de tau avec la membrane plasmique est médiée par une région riche en proline du domaine N-terminal de tau et par un domaine spécifique SH3 de tyrosine kinases non-réceptrices de la famille src (Lee et al., 1998). En effet, tau co-localise avec fyn, juste sous la surface de la membrane plasmique. Cette localisation permettrait à la protéine tau de moduler le réseau des microtubules selon les signaux externes. En plus d'interagir avec les microtubules, ce complexe permettrait à la protéine tau de moduler le cytosquelette d'actine. En effet, cette association établit un lien entre les fibres d'actine adjacentes à la membrane plasmique et la protéine tau. À l'aide de formes mutantes de tau qui miment la phosphorylation de la protéine, Maas et al. (2000) ont aussi démontré que cette association est très sensible à l'état de phosphorylation de la protéine tau. Lorsque la protéine tau présente une conformation mimant la phosphorylation, l'interaction avec la membrane plasmique est abolie, tandis que son association avec les microtubules est préservée.

Par ailleurs, en plus de fyn, la protéine tau interagit aussi avec la phospholipase C- γ (PLC- γ) de la membrane plasmique. Cette liaison implique encore une fois le domaine N-terminal de la protéine tau, ainsi que le domaine

SH3 de la phospholipase (Hwang et al., 1996). La protéine tau peut donc également moduler les signaux de transduction cellulaire via la PLC- γ .

Bien que cette association soit controversée, un autre groupe de chercheurs a rapporté une interaction potentielle entre les MAPs, tau et MAP2, et les mitochondries (Jancsik et al. 1989). Contrairement à l'association avec la membrane plasmique, tau se lie à la membrane des mitochondries via le domaine C-terminal responsable de son interaction avec les microtubules. Le rôle spécifique de cette interaction reste à déterminer, mais les MAPs semblent être impliquées dans le transport des mitochondries.

Outre, ces deux éléments membranaires, tau établit également des liaisons avec plusieurs autres protéines : les phosphatases PP1 et PP2A, la kinase cdk5, la protéine chaperone Pin-1, les protéines « heat shock » HSP70 et HSP90, la spectrine, l'actine, la préseline 1 (PS1), l' α -synucléine, la sous unité régulatrice p85 α de la 3-kinase phosphatidylinositol, la protéine C Eed, une famille de protéines exprimant une séquence Alu ainsi que la ferritine (Buée et al., 2000).

Récemment, une étude a montré dans des modèles cellulaires l'implication de tau dans le transport axonal. Stamer et al. (2002) ont, en effet, observé que tau inhibe le transport axonal kinésine-dépendant des neurofilaments, des peroxysomes, des mitochondries et des vésicules golgiennes dans des cultures neuronales (Ebner et al., 1998). Cette altération du transport qui entraîne une accumulation somatique des éléments membranaires serait engendrée par l'interférence entre la protéine tau et les protéines motrices. En effet, il a été démontré in vitro que la liaison de la kinésine aux microtubules était diminuée en

présence de tau, ce qui favoriserait un transport préférentiellement rétrograde (Heins et al., 1991). Il a également été rapporté que la surexpression de tau dans les astrocytes entraîne une diminution de la quantité de kinésine, favorisant ainsi l'accumulation des organites membranaires dans la région périnucléaire (Yoshiyama et al., 2003). En raison de sa longueur, l'axone est particulièrement susceptible aux perturbations du transport cellulaire. La surexpression de tau rend le neurone plus vulnérable aux différents stress en le privant d'énergie et en favorisant l'accumulation de déchets neurotoxiques.

Ainsi, bien que la fonction de chacune de ces interactions de tau ne soit pas élucidée, il est fort probable qu'une perturbation de la protéine tau puisse aussi entraîner bien plus qu'une instabilité du cytosquelette.

IV Objectifs de travail: association de tau avec les membranes golgiennes.

Outre la membrane plasmique et les mitochondries, la protéine tau pourrait être associée à d'autres membranes. Compte tenu du rôle et de la structure de l'appareil de Golgi, la protéine tau pourrait aussi interagir avec cette organite. L'appareil de Golgi est composé d'une série de citernes parallèles interconnectées et subdivisées en 3 sous compartiments bien définis (**Figure 5**). C'est à travers ce réseau complexe de saccules que l'appareil de Golgi modifie les hydrates de carbone, les lipides et les protéines. Situé à proximité du noyau, l'appareil de Golgi entretient une relation étroite avec les microtubules. En effet,

l'appareil de Golgi est accolé au centre organisateur des microtubules (MTOC) (Chabin-Brion et al., 2001). Cette localisation se révèle d'une importance capitale puisque les microtubules sont essentiels au maintien de l'organisation et de la fonction de l'appareil de Golgi. En effet, par suite du traitement de cellules en culture avec un agent dépolymérisateur des microtubules comme le nocodazole, on observe un effondrement et une fragmentation de l'appareil de Golgi (Thyberg and Moskalewski, 1999). D'autre part, c'est le long des microtubules que s'effectue le transport des vésicules golgiennes destinées aux différents compartiments cellulaires. En raison de son interaction privilégiée avec le cytosquelette, tau pourrait constituer le lien entre l'appareil de Golgi et les microtubules.

Afin de déterminer si tau interagit réellement avec l'appareil de Golgi, nous avons tout d'abord procédé à un fractionnement subcellulaire à partir d'homogénats de cerveau de rats. Cette technique nous a permis d'obtenir des fractions enrichies en protéines cytosoliques, golgiennes et du réticulum endoplasmique. Nous avons par la suite analysé par immunobuvardage la distribution de tau dans les différentes fractions et déterminé si tau était enrichie dans la fraction contenant les protéines golgiennes. Nous avons également étudié ces fractions en microscopie électronique en regardant plus particulièrement la fraction golgienne. Nous avons utilisé une technique de co-immunoprécipitation afin d'isoler les protéines membranaires associées à la protéine tau. Finalement, nous avons déterminé la localisation de la protéine tau *in vivo* grâce à des techniques immunocytochimiques. Le marquage à l'or colloïdal couplé à un

anticorps contre tau, nous ont permis d'étudier plus précisément la distribution de la protéine tau dans les sous-compartiments golgiens. Grâce à différents anticorps phosphodépendants, nous avons également tenté de déterminer quels résidus de sérine et thréonine phosphorylés étaient impliqués dans l'association de la protéine tau à l'appareil de Golgi.

Tableaux et légendes

Tableau I Présence de tau dans différentes maladies.

Tableau résumant les différentes maladies où l'on retrouve des éléments neuropathologiques impliquant la protéine tau. Les tauopathologies regroupent les démences où l'agrégation de la protéine tau est l'élément neuropathologique principal. Cette famille de maladies comprend outre la maladie d'Alzheimer quatre démences fronto-temporales: la dégénérescence corticobasale, la maladie de Pick, la paralysie supranucléaire progressive et la démence fronto-temporale avec parkinsonisme associée au chromosome 17. D'autres maladies présentent également des agrégats de tau sans toutefois faire partie des tauopathologies.

Tableau I**Présence de tau dans différentes maladies****Tauopathologies**

Maladie d'Alzheimer

Démences fronto-temporales

Dégénérescence corticobasale

Maladie de Pick

Paralysie supranucléaire progressive

Démence fronto-temporale avec parkinsonisme associée au chromosome 17

Autres maladies avec agrégats de tau

Sclérose latérale amyotrophique

Démence avec grain argyrophilique

Maladie de Creutzfeldt-Jakob

Démence des pugilistes

Enchevêtrements neurofibrillaires diffus avec calcification

Syndrome de Down

Maladie de Gerstmann-Straüssler-Scheinker

Maladie d'Hallervorden-Spatz

Dystrophie myotonique

Maladie de Niemann-Pick, de type C

Maladie non-Guamanienne des neurones moteurs avec enchevêtrements neurofibrillaires

Parkinsonisme postencephalitique

Angiopathies avec prion et amyloïde cérébral

Gliose subcortical progressive

Panencephalite sclérosante subaigüe

Tableau II Tableau des mutations du gène de tau.

Tableau des mutations du gène de tau chez l'humain, représentant leur localisation, ainsi que l'effet sur l'épissage de l'exon 10 et la polymérisation des microtubules.

Tableau II

Mutation	Localisation	Épissage de l' exon 10	Polymérisation des microtubules
K257T	E9,R1	Pas de changement	Diminution
I260V	E9,R1	Pas de changement	ND
G272V	E9,R1	Augmentation	Diminution
N279K	E10,IR1-2	Diminution	Pas d'effet
Δ280K	E10,IR1-2	Augmentation	Diminution
L284L	E10,IR1-2	Augmentation	Pas d'effet
N296N	E10,R2	Pas de changement	Pas d'effet
P301L	E10,R2	Pas de changement	Diminution
P301S	E10,R2	Augmentation	Diminution
S305N	E10, IR2-3	Augmentation	Pas d'effet
S305S	E10, IR2-3	Augmentation	Pas d'effet
E10+3	I10	Augmentation	Pas d'effet
E10+12	I10	Augmentation	Pas d'effet
E10+13	I10	Augmentation	Pas d'effet
E10+14	I10	Augmentation	Pas d'effet
E10+16	I10	Augmentation	Pas d'effet
E9+33	I9	ND	ND
V337M	E12,IR3-4	Pas de changement	Diminution
E342V	E12,IR3-4	ND	ND
G389R	E13	Pas de changement	Diminution
R406W	E13	Pas de changement	Diminution

E, exon; I, intron; ND, non déterminé. Tableau adapté de Lee et al., 2001

Figures et légendes

Figure 1 Représentation schématique d'un neurone.

Les compartiments dendritiques et axonaux présentent de nombreuses différences au plan morphologique et fonctionnel. L'axone est habituellement unique, long et étroit, alors que les dendrites sont nombreuses, relativement larges et courtes. Le compartiment axonal est responsable de la transmission de l'influx nerveux et les dendrites sont principalement impliquées dans la réception des signaux provenant de l'environnement. Dans l'axone les microtubules sont stabilisés par la protéine tau alors que MAP2 remplit cette fonction dans les dendrites. Figure adaptée de Kandel et al., 2000

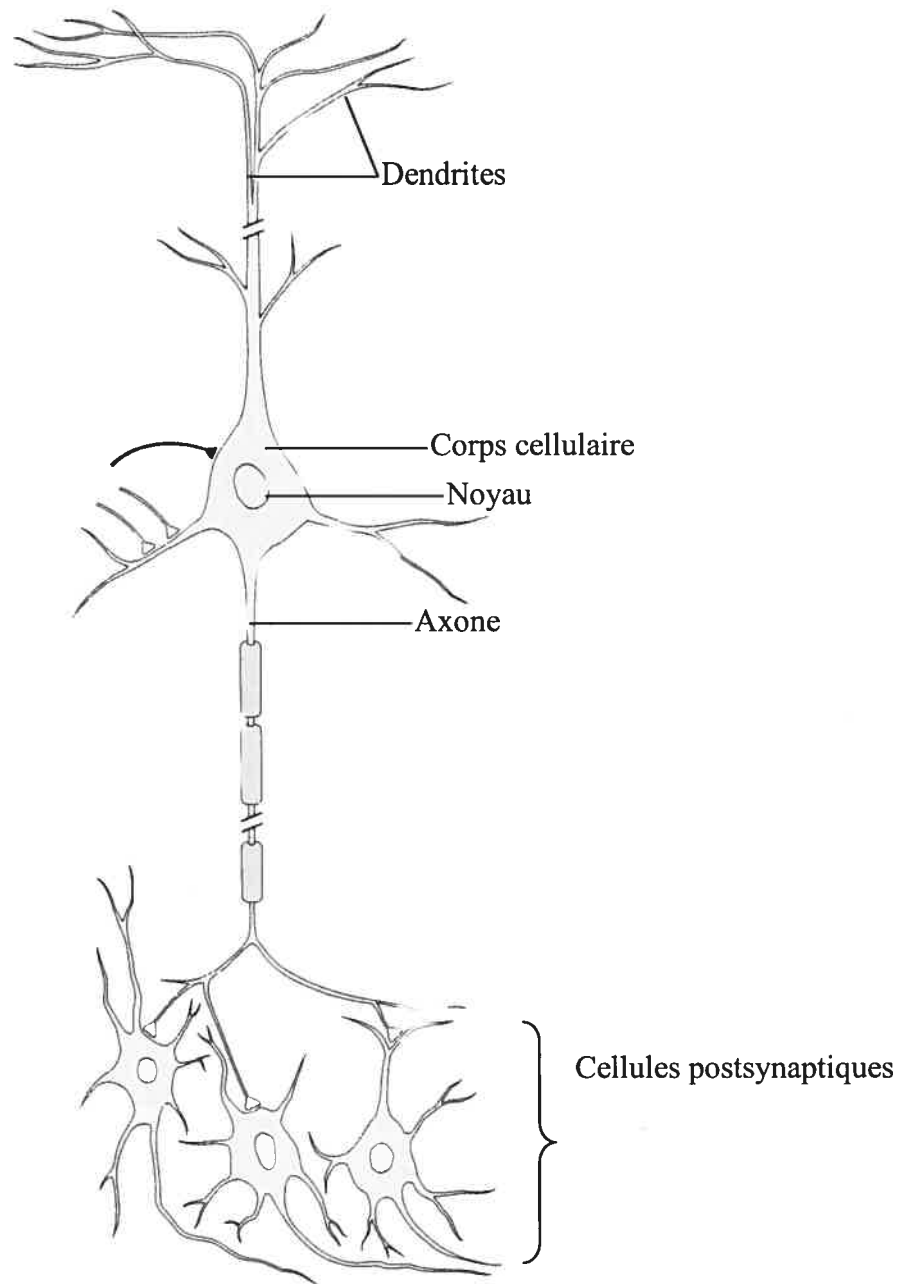
Figure 1

Figure 2 Représentation des six isoformes de tau.

Représentation schématique des six isoformes du système nerveux central (SNC) engendrées par suite de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. Les isoformes contenant la région N-terminal 1N, 0N et 2N correspondent respectivement à 54%, 37% et 9% de l'expression de tau chez l'adulte. Dans le système nerveux périphérique une forme supplémentaire de tau appelée « Big Tau » est également exprimée.

Figure 2

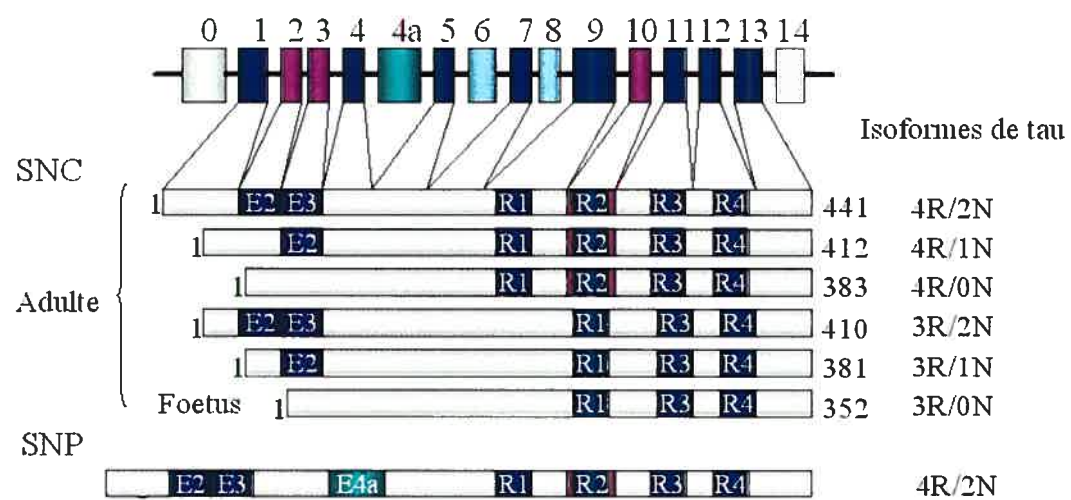


Figure 3 Phosphorylation de tau.

Représentation schématique des nombreux sites de phosphorylation de la protéine tau sur son isoforme la plus longue, 4R/2N. La majeure partie des sites sont situés à proximité ou à l'intérieur des domaines de liaison aux microtubules. Les sites correspondent soit à une sérine (S) soit à une thréonine (T).

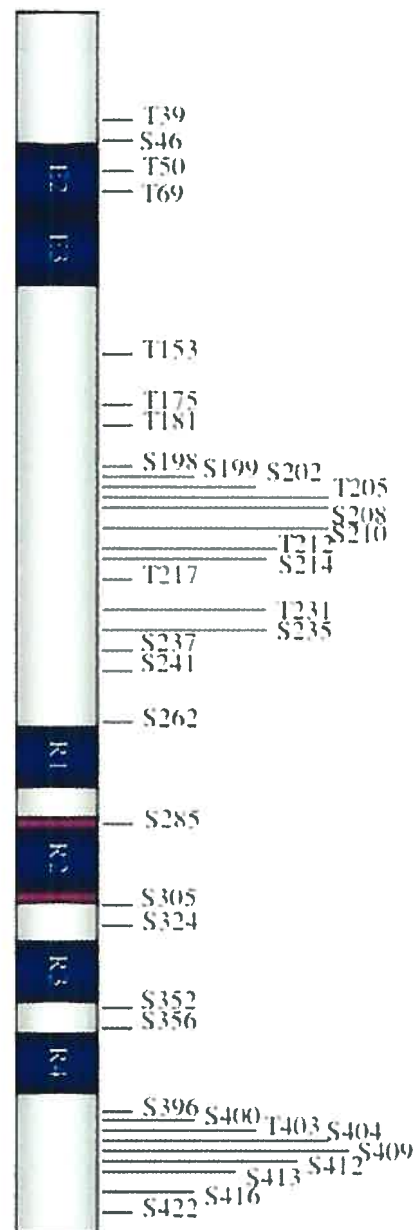
Figure 3

Figure 4 Implication de tau dans la neurodégénérescence.

Représentation schématique illustrant l'implication de la protéine tau dans la perturbation du fonctionnement du neurone. L'hyperphosphorylation de tau par les kinases entraînerait le détachement de la protéine conduisant à une instabilité du réseau microtubulaire. L'accumulation intracellulaire de tau hyperphosphorylée serait responsable de la formation d'agrégats. (Modèle adapté de Mandelkow and Mandelkow, 1998)

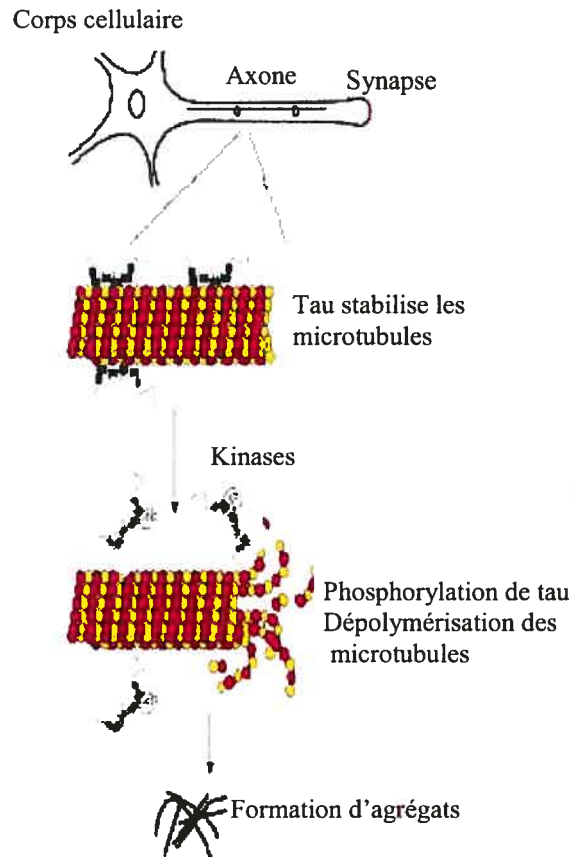
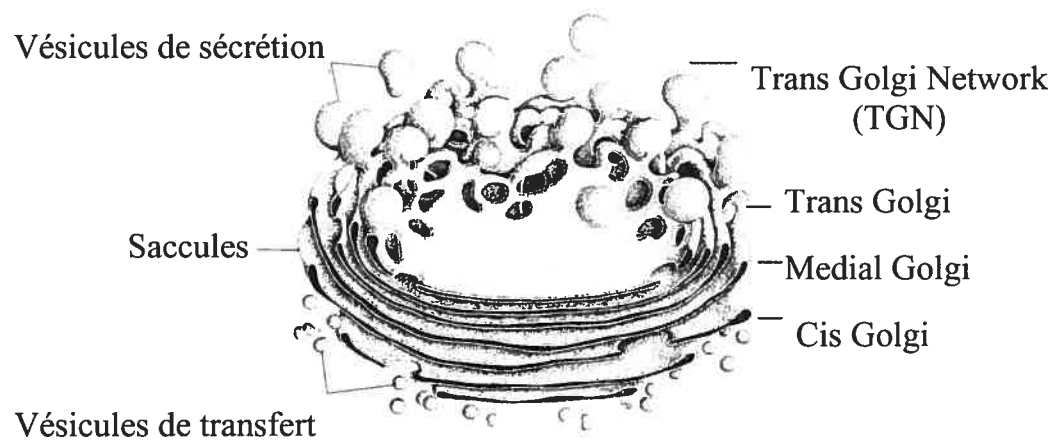
Figure 4

Figure 5 Structure de l'appareil de Golgi.

Illustration de l'appareil de Golgi représentant ses différents sous compartiments.

Le transit à travers les saccules golgiennes se fait habituellement de la partie cis vers la partie trans avant de parvenir au réseau trans golgien où s'effectue la sécrétion des protéines et des membranes. Les vésicules de transfert correspondent aux COPs et sont impliquées dans le transport des éléments du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. (Illustration adaptée de Ham A. W. 1974)

Figure 5

Chapitre deuxième

Article soumis au Journal of Neurochemistry

*Association of tau with the Golgi membranes :
a new key in tau function*

Association of tau with the Golgi membranes: a new key in tau function

Sébastien Perreault, Carole Abi Farah, Dalinda Liazoghli, Mylène Desjardins, Jacques Paiement and Nicole Leclerc

*Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal,
C.P.6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7*

Corresponding author:

Dr. Nicole Leclerc

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C.P.6128, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

Canada H3C 3J7

Phone: (514)-343-5657

Fax: (514)-343-5755



Abstract

Tau, a microtubule-associated protein enriched in the axon, is known to stabilize and promote the formation of microtubules during axonal formation. Several studies have reported that tau was associated to membranes. However, many of these interactions are still controversial. In the present study, we further characterized the interaction of tau with membranous elements by examining its distribution in subfractions enriched in either Golgi or endoplasmic reticulum membranes isolated from rat brain. A subfraction enriched in markers of the medial Golgi compartment, MG160 and mannosidase II, presented a high tau content indicating that tau could be associated to Golgi membranes. Electron microscope morphometry confirmed the enrichment of this subfraction in Golgi membranes. Furthermore, double-immunogold labeling experiments were conducted, on this subfraction, to show the association of tau with Golgi vesicles. Tau-immunogold was observed on vesicles labeled with either an antibody directed against MG160, the medial Golgi marker or TGN38, a marker of the Trans Golgi network. The association of tau with the medial Golgi membranes was confirmed by co-immunoprecipitation of a Golgi protein complex containing MG160 with an anti-tau antibody. Furthermore, confocal microscope analysis of the distribution of tau and MG160, in cultured hippocampal neurons, revealed that these two proteins partially co-localized at the periphery of the Golgi membranes. Electron microscope immunogold was employed to confirm the presence of tau on the Golgi membranes in intact neurons in the spinal cord. Most notably, this technique revealed a gradient of association of tau with Golgi membranes. Tau

was found in all Golgi compartments but increased toward the trans side of the Golgi. Finally, the pool of tau present in the Golgi subfraction was phosphorylated at the sites recognized by the phosphorylation-sensitive antibody PHF-1.

Keywords: Tau, Golgi apparatus, neuronal polarity

Running title: Tau is associated to Golgi membranes

Introduction

Tau is a neuronal microtubule-associated protein (MAP) that is enriched in the axonal compartment (Buée et al. 2000). In vitro studies have shown that tau can stabilize microtubules by decreasing their dynamic instability (Garcia and Cleveland 2001). Consistently, the suppression of tau expression results in a decrease of a pool of stable microtubules in primary neuronal cultures (Caceres et al. 1991). Moreover, the suppression of tau expression impairs the differentiation of the axonal process in these cultures (Caceres et al. 1991; Dawson et al. 2001). Recently, tau was shown to be involved in the transport of membranous organelles. Overexpression of tau in both neuronal and nonneuronal cells resulted in the accumulation of mitochondria, Golgi membranes and peroxisomes in the perinuclear region and their loss at the cell periphery (Ebner et al. 1998; Stamer et al. 2002). This redistribution of membranous organelles might be caused by the impairment of the motor protein binding to microtubules by tau. Because of the increased association of tau with microtubules, this may cause a steric hindrance along microtubules preventing microtubule-motor interaction. Indeed, in vitro studies showed that kinesin binding to microtubules was decreased in the presence of tau (Heins et al. 1991). More recently, it was reported that the overexpression of tau in astrocytes also induced an accumulation of membranous organelles in the perinuclear region (Yoshiyama et al. 2003). This was accompanied by a reduction of detyrosinated tubulin and a decrease of kinesin protein level. Thus, tau might impair the transport of organelles by affecting diverse aspects of it.

In addition to its interaction with microtubules, tau was also found to be associated with the plasma membrane (Brandt et al. 1995). This interaction was shown to be necessary to induce axonal-like processes in PC12 cells. A proline rich sequence located in the amino-terminal of tau is involved in this interaction by mediating the association of tau to the SH3 domains of Fyn and src non-receptor tyrosine kinases (Lee et al. 1998). The localization of tau at the plasma membrane suggests that tau might establish a link between external signals and the microtubule network. Furthermore, other membranous associations were reported for tau such as its association with the outer membrane of mitochondria (Jung et al. 1993). However, these interactions remain controversial.

The function of tau is tightly regulated by its phosphorylation state. For example, an increase of tau phosphorylation reduces its binding affinity for microtubules (Buée et al. 2000). As noted for its binding to microtubules, the association of tau to the plasma membrane is also regulated by its phosphorylation state. Indeed, an increase of tau phosphorylation impairs its association with the plasma membrane (Maas et al. 2000). In Alzheimer's disease (AD), tau becomes hyperphosphorylated and aggregates in insoluble filaments called paired helical filaments (PHFs) (Lee et al. 2001). It is believed that hyperphosphorylated tau contributes to neurodegeneration by detaching from microtubules and destabilizing the axonal microtubule network. However, since tau interaction with the plasma membrane is also abolished by an increase of its phosphorylation, it indicates that in neurodegenerative conditions, the

interaction of tau with the plasma membrane could also be compromised and contribute to neuronal dysfunction.

Microtubules are known to contribute to the cellular distribution of membranous organelles and to the maintenance of their morphology (Lucocq et al. 1987; Lucocq and Warren 1987). This occurs through numerous proteins able to link both microtubules and membranous organelles (Bloom and Brashear 1989; Lutjens et al. 2000; Walenta et al. 2001; Lallemand-Breitenbach et al. 2004; Ríos et al. 2004). Most importantly, these proteins can participate to the segregation of membranous organelles within a polarized cell such as a neuron. Indeed, CLIP-115 by establishing a link between microtubules and a membranous organelle termed lamellar bodies, contributes to its polarized distribution in the somato-dendritic compartment in neurons (De Zeeuw et al. 1997). Here, we describe the association of tau with a subpopulation of Golgi membranes by using subcellular fractionation, co-immunoprecipitation and electron microscope immunocytochemistry in rat brain. The present results indicate that tau could be involved in linking together Golgi membranes and microtubules.

Materials and Methods

Subcellular fractionation

Adult Sprague-Dawley rats were purchased at Charles River (Charles River Laboratories Inc., Montreal, Quebec, Canada). The use of animals and all surgical procedures described in this article were carried out according to *The guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care*. Brain was dissected from twenty adult Sprague-Dawley rats. Subcellular fractions were generated by using the protocol previously described by Lavoie et al. (Lavoie et al. 1996). A schematic of the protocol is shown in Fig. 1. Briefly, total microsomes were isolated by differential centrifugation and ER and Golgi elements were subsequently separated by ultracentrifugation in a sucrose step-gradient.

Immunoblot analysis

Protein assay was performed (Bio-Rad kit, Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). Equal amounts of proteins were loaded in each lane and electrophoresed in a 7.5% polyacrylamide gel. Following separation, proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. The nitrocellulose strips were incubated with the primary antibodies during 90 min at room temperature. They were then washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) and then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies. Membranes were again washed and then revealed by chemiluminescence

(Amersham Pharmacia Biotech, Quebec, Quebec, Canada). The following primary antibodies were used: the monoclonal antibody anti-MAP2 (clone HM2, Sigma, Oakville, ON), the monoclonal antibodies anti-tau, Tau-1 directed against unphosphorylated tau (Oncogene Research Products, San Diego, California) and 49.2 (kindly provided by Virginia M-Y Lee, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA), a polyclonal antibody anti-tau (kindly provided by Virginia M-Y Lee, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA), the monoclonal antibodies AT8 (Pierce Endogen, USA), CP9 and PHF-1 (kindly provided by Dr. Peter Davies, Albert Einstein, NY, USA) directed against phosphorylated tau, the monoclonal antibody anti- α -tubulin (clone DM 1A, Sigma, Oakville, ON), a polyclonal antibody against ribophorin (kindly provided by Dr. G. Kreibich, New York University School of Medicine, New York, New York), a polyclonal antibody against calnexin (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada), a polyclonal antibody against mannosidase II (kindly provided by Dr. M.G. Farquhar, University of California, San Diego), a polyclonal against NaK-ATPase (kindly provided by Dr. D. Fambrough, The Johns Hopkins University, Maryland), a monoclonal directed against MG160 (kindly provided by Dr. N. Gonatas, University of Pennsylvania, Philadelphia), GM130 (Oncogene, USA) and TGN38 (Serotec, UK).

Co-immunoprecipitation

Total microsomes prepared from adult rat brain were resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0.2% Triton X-100, pH 7.4.

The microsomes were sonicated for 5 sec at amplitude 6% and then were centrifuged for 5 min at 12000 rpm to sediment protein aggregates. The supernatant was incubated with a primary antibody directed against tau (polyclonal antibody) overnight at 4°C. The following day the sepharose beads were added to the solution for two hours. The beads were washed several times. The immunoprecipitate was analyzed by western blot.

Electron microscopy on the Golgi subfraction

Microsomes isolated from brain were fixed using 2.5% glutaraldehyde, recovered onto Millipore membranes by the random filtration technique of Baudhuin et al. (Baudhuin et al. 1967) and processed for electron microscopy as previously described (Lavoie et al. 1996).

Cell cultures

Primary embryonic hippocampal cultures were prepared as previously described (Banker and Goslin 1998). Hippocampi from 18-day-old fetuses were treated with trypsin (0,25% at 37°C for 15 min) then washed in Hank's balanced solution and dissociated by several passages through a constricted Pasteur pipette. The cells were then plated on glass coverslips coated with polylysine. Then, after 4 h to allow the attachment of the cells to the substrate, the hippocampal cells were inverted to face a monolayer of glial cells in a serum-free medium.

Immunofluorescence

Neurons were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 30 minutes. The cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 minutes. The tau protein was revealed either using the monoclonal antibody 49.2 or a polyclonal antibody. The Golgi apparatus was revealed using either a monoclonal antibody directed against GM130, MG160 or a polyclonal antibody directed against TGN38. To visualize the microtubules, either a polyclonal antibody directed against tubulin (Abcam, Cambridge, UK) was used (1:100) or a monoclonal antibody directed against β -tubulin (DSHB, University of Iowa, Iowa City, IA). We used the following secondary antibodies: a donkey anti-rat conjugated to FITC (dilution 1:100), a donkey anti-rabbit conjugated to Rhodamine (1:500) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Bio/Cam, Mississauga, Ontario, Canada), an Alexa Fluor 647 anti-mouse (1:400) and an Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:200) (Molecular Probes, Eugene, OR). All these antibodies were diluted in 5% BSA/PBS. Incubations were carried out at room temperature for 1 hour. After three washes in PBS, the coverslips were mounted in polyvinyl alcohol (Calbiochem, CA, USA). Fluorescently labelled cells were visualized with a Leica TCS-SP1 confocal microscope using 63x or 100x objectives.

Electron microscope immunocytochemistry on spinal cord sections

Adult mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (somnotol, 65 mg/kg i.p.). They were perfused through the ascending aorta with 20 ml of

0.1M cacodylate buffer (CB, pH 7.4; room temperature), followed by 100 ml freshly prepared fixative containing 2.5% glutaraldehyde (J.B.EM, Pointe Claire, Dorval, Québec, Canada) and 1% paraformaldehyde (Fisher, NJ, USA) in CB. The spinal cords were removed and kept in the same fixative for 1h at room temperature after which they were washed in CB. The spinal cords were cut in sections of 100µm with a vibratome. The sections were postfixated in 1% osmium tetroxide (J.B.EM, Pointe Claire, Dorval, Québec, Canada) and 1.5% potassium ferrocyanide (Sigma) in CB for 30 min at 4°C. After an extensive wash in buffer, the sections were dehydrated in a graded series of alcohols at 4°C, then washed twice for 10 min in 100% ethanol at room temperature and embedded in LR white resin (J.B.EM). The resin was polymerized under anaerobic conditions for 48 h at 56°C. Ultrathin sections (approximately 60 nm) were cut with an ultramicrotome and placed on single slot nickel grids coated with Pioloform. These sections were then processed for postembedding immunocytochemistry with an antibody directed against tau (polyclonal antibody) as described in our previous study (Micheva et al. 1998).

Statistical analysis

The statistical significance of the number of gold particles in the Golgi compartments on spinal cord sections was determined using an ANOVA one-way test followed by Tukey-Kramer multiple comparison test. Statistical significance was accepted if $p < 0.05$.

Results

The distribution of tau in subcellular fractions prepared from adult rat brain

The present study aimed to further characterize the interaction of tau with membranous elements. To do this, subfractions enriched in ER and Golgi membranes were purified from adult rat brain using the fractionation protocol summarized in Figure 1A (Lavoie et al. 1996). These subfractions were characterized by using different membranous markers: ribophorin and calnexin as ER markers, mannosidase II, MG160, GM130 and TGN38 as Golgi markers and Na-K-ATPase as a marker of the plasma membrane. As shown in Figure 1B, the ER markers were concentrated in the RM fraction. The Golgi markers were enriched in the subfractions termed I2 and I3 each of these fractions presenting an enrichment of Golgi proteins belonging to distinct compartment. Based on staining intensity, GM130, a marker of the cis-Golgi was concentrated in the I3 subfraction and MG160 and mannosidase II, two markers of the medial Golgi compartment were enriched in the I2 subfraction. TGN38 was enriched in both I2 and I3 subfractions. The plasma membrane marker, Na-K-ATPase was also present in the I2 and I3 subfractions. Tau was enriched in the cytosolic fraction as noted for tubulin. Surprisingly, a significant amount of tau (~15%) was present in the I2 subfraction containing plasma membrane and Golgi membrane markers (Figure 1B). Previous studies reported that tau was associated to the plasma membrane (Brandt et al. 1995). However, in the present subcellular fractionation conditions,

the distribution of tau and the plasma membrane marker, Na-K-ATPase did not correspond since tau was barely detectable in the I3 subfraction. Interestingly, the distribution of tau was similar to that of two markers of the medial Golgi compartment, MG160 and mannosidase II (Velasco et al. 1993; Torre and Steward 1996; Gonatas et al. 1998). This suggested a direct association of tau with the membranes of the medial Golgi compartment. Very little tau was found in the I3 subfraction enriched in the Golgi cis compartment marker, GM130. Similarly, a small amount of tau was found in the RM fraction enriched in ER markers. In contrast, MAP2, the dendritic MAP that shares sequence homology with tau in the microtubule-binding domain was highly concentrated in the RM fraction. This specific interaction of MAP2 with ER membranes was characterized elsewhere (Abi Farah et al. 2004). Taken together, the above data suggested that tau could be associated to Golgi membranes of the medial compartment in the I2 subfraction. However, the plasma membrane marker Na-K-ATPase was also noted in this subfraction and therefore the association of tau with these membranes could not be ruled out.

Localization of tau in the I2 subfraction

To confirm the association of tau with the Golgi membranes, electron microscope immunocytochemistry of tau was performed on the I2 subfraction. Both vesicles and tubules with associated fenestrations reminiscent of the Golgi membranes were found in this subfraction (Figure 2). Quantification of the gold particle distribution from three different sets of experiments revealed that 82.1% of

tau staining was associated with membranes in the I2 subfraction (see Table I). To confirm the association of tau with the Golgi membranes, double electron microscope immunocytochemistry was carried out using either TGN38 or MG160 as Golgi markers and an anti-tau antibody (Figure 3). Tau immunolabeling was found on membranes labeled either with MG160 or TGN38. A quantitative analysis revealed on average 32% (n=2) and 54% (n=2) of the membranous labeling of tau on membranes containing MG160 and TGN38 respectively. The rest of tau staining was found on non-labeled membranes or associated with the background. Thus, from these data one could conclude that tau was associated to membranes of the medial Golgi compartment and the TGN. The double labeling studies suggest that tau protein detected by western blot in the I2 membrane subfraction was found on bone fide Golgi membranes. The association of tau with the Golgi membranes was independent of microtubules since none were observed in this subfraction.

Co-immunoprecipitation of a Golgi protein complex and tau in adult rat brains

The association of tau with the Golgi membranes was further demonstrated by co-immunoprecipitation experiments. Total microsomes from adult rat brains were prepared by a standard method (Abi Farah et al. 2003). An anti-tau antibody was used to immunoprecipitate tau and the presence of Golgi proteins in tau immunoprecipitate was analyzed by western blotting. As shown in Figure 4A, the protein MG160 was present in tau immunoprecipitate indicating that tau was associated to membranes of the medial Golgi compartment. However, the presence

of the cis Golgi compartment marker, GM130 was not or barely detectable in tau immunoprecipitate. This confirmed the above data from the subcellular fractionation that showed very little tau in the I3 subfraction immunoreactive to GM130. The ER marker, calnexin was detected at background level in tau immunoprecipitate showing that, in the present experimental conditions, tau was predominantly associated to the Golgi membranes.

To verify whether the association of tau with the Golgi membranes was peripheral, the I2 subfraction was treated with sodium carbonate buffer at pH 11.0, a procedure known to dissociate the peripheral proteins from the membranes (Figure 4B) (Wiedenmann et al. 1985). Under this treatment, tau mostly detached from the membranes indicating that it is a peripheral membrane protein in the I2 rat brain Golgi subfraction.

Enrichment of tau in the perinuclear region containing the Golgi apparatus in primary hippocampal neurons

We examined the co-localization of tau with the Golgi membranes in primary hippocampal cells. As previously described, after one day in culture, the hippocampal neurons are polarized cells presenting 3 to 4 short minor neurites that will differentiate to become dendrites and a long thin neurite which develops into the axon (Bartlett and Banker 1984a, b; Dotti et al. 1988). All these neurites terminate in a growth cone, a motile structure presenting a rich actin network at the periphery and bundles of microtubules at the center (Goslin et al. 1989). In the subsequent days of culture, the minor neurites differentiate into dendrites. After

seven to ten days in culture, the dendrites and axon are fully developed and the synaptic contacts are established. To study the distribution of tau in primary hippocampal neurons, cells were labeled with either the monoclonal antibody, 49.2 or a polyclonal antibody (kindly provided by Dr. V.-W. Lee, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) that recognize all tau isoforms expressed in these neurons. The Golgi apparatus (GA) was stained with an antibody directed against either GM130, MG160 or TGN38. In seven-day old primary hippocampal neurons cultured in N2 medium, tau does not compartmentalize to the axonal process but remains in all neuronal compartments (Figure 5) (Kempf et al. 1996). The distribution of the GA in seven-day old hippocampal neurons examined using any antibody recognizing the Golgi proteins enumerated above, was mostly restricted to the cell body in the perinuclear region (Figure 5). However, some staining was also present along the neurites (Figure 5). In neurons that were double labeled for tau and MG160, an enrichment of tau staining was found in the perinuclear region where the GA is located. In a merged image of MG160 (red) and tau (green) staining, a yellow signal was observed at the periphery of the GA tubules indicating a coincidence of the two staining in this region. Furthermore, tau and the Golgi markers presented similar enrichments along the neurites (Figure 5). Collectively, the above observations indicated a possible association between tau and the Golgi membranes in hippocampal neurons.

Localization of tau at the Golgi apparatus by electron microscope immunocytochemistry on motoneurons

The localization of tau at the GA was examined in motoneurons of mouse spinal cord by electron microscope immunocytochemistry. These neurons have the advantage of presenting a large GA with multiple stacks of Golgi saccules which appear discontinuous around the nucleus (Peters et al. 1976). No gold particles were found when the primary antibody directed against tau was omitted as well as when this primary antibody was preabsorbed with pure tau protein. As expected, tau staining was found on the axonal microtubules (Figure 6). Some staining was also present in the cytoplasm not associated to any structure. Remarkably, tau staining was observed on the Golgi membranes and appeared to be more concentrated to one side of the GA (Figure 7). To confirm this, a quantitative analysis of the number of gold particles per μm^2 of the different Golgi compartments, cis, medial and trans was carried out. Fenestration was used to identify the cis side of the GA and clathrin-coated vesicles to identify the trans Golgi side (Peters et al. 1976; Rambourg and Clermont 1990; Marsh et al. 2001). For the quantitative analysis, a total of 35 GA that presented a morphology allowing to distinguish the cis and trans side were selected from two animals. The surface of each Golgi compartment was directly measured on enlarged electron negatives using the image analysis system Northern Eclipse. Then, the number of gold particles found in these compartments was counted (gold particles/ mm^2). The quantitative analysis revealed that 14.3 ± 2.1 , 22.6 ± 2.4 and 36.7 ± 3.5 gold particles/ μm^2 were found on the cis, medial and trans Golgi compartments respectively (Figure 8). The number of gold particles per mm^2 of Golgi membranes

was significantly higher on the trans Golgi compartment than that on the cis and medial compartments. This data was consistent with the immunoblot data and suggested that tau was preferentially associated with membranes of the medial and trans Golgi.

Phosphorylated tau associated with Golgi membranes

It was previously shown that the pool of tau found at the plasma membrane was not phosphorylated at the sites recognized by the phosphorylation-sensitive antibodies PHF-1, AT-8 and AT-180 and was dephosphorylated at the Tau-1 antibody site in PC12 cells (Maas et al. 2000). The presence of phosphorylated tau at the sites recognized by the phosphorylation-sensitive antibodies PHF-1, AT-8 and CP9 was shown in normal adult rat brain by western blot (Jicha et al. 1999). To verify whether phosphorylated tau was found on the Golgi membranes in adult rat brain, we investigated the phosphorylation state of tau in the I2 Golgi subfraction. In contrast to the pool of tau found at the plasma membrane, tau present in the I2 subfraction was phosphorylated at the sites recognized by the antibody PHF-1 (Ser396/Ser404) (Figure 9). However, very little immunoreactivity to the AT-8 antibody was noted in this fraction indicating that Ser199, Ser202 and Thr205 were not highly phosphorylated. Consistent with this result, tau found in the I2 subfraction was immunoreactive for the antibody Tau-1 that recognizes tau dephosphorylated at the region extending from 187-205 residues (Buée et al. 2000). Moreover, tau present in the I2 subfraction did not react with the phosphorylation-sensitive antibody CP9 directed against tau

phosphorylated on Thr231. Phosphorylated tau at PHF-1 is most likely associated to Golgi membranes in the I2 subfraction. This fraction also contains membranes originating from the plasma membrane and the ER. According to a previous study, tau phosphorylated at the sites of the PHF-1 antibody was not found at the plasma membrane and in the present study, we showed that very little tau phosphorylated at the PHF-1 sites is found in the RM fraction. Taken together, these results strongly indicate that a pool of tau phosphorylated at Ser396 and Ser404 is associated to the Golgi membranes.

By using the phosphorylation-sensitive antibodies described above, we also detected distinct pools of phosphorylated tau in the I3 and RM subfractions. Tau found in the I3 subfraction was mainly immunoreactive to the AT-8 antibody. Moreover, no immunoreactivity to Tau-1 antibody was detected in this subfraction. On the other hand, tau found in the RM fraction was weakly immunoreactive to AT-8, PHF-1 and CP-9. From these results, one can conclude that different pools of phosphorylated tau exist within a neuron and these pools are most likely associated to different membranous compartments.

Discussion

In the present study, we demonstrated that tau was associated to the Golgi membranes. Tau was preferentially found in a Golgi subcellular fraction enriched in membranes originating from the medial Golgi compartment and TGN. Electron microscope immunocytochemistry using double-labeling confirmed that tau was associated with membranes labeled with the Golgi markers GM160 and TGN38. The interaction of tau with the medial Golgi membranes was further confirmed by co-immunoprecipitation of a Golgi protein complex that contained the medial Golgi protein, MG-160 with an anti-tau antibody. Electron microscope immunocytochemistry revealed that tau association with the Golgi membranes was found in all Golgi compartments but increased toward the trans side. Moreover, the pool of tau present in the Golgi fraction was phosphorylated at the sites recognized by the phosphorylation-sensitive antibody PHF-1.

The most obvious function of tau on the Golgi membranes would be to mediate the interaction between these membranes and microtubules. In this context, tau is not the sole microtubule-binding protein that could play such a role. Indeed, other microtubule-associated proteins including FTCD, SCG10, GMAP-210, CLIPR-59 and Hook3, are also associated with the Golgi membranes (Bloom and Brashear 1989; Lutjens et al. 2000; Walenta et al. 2001; Lallemand-Breitenbach et al. 2004; Ríos et al. 2004). As noted for tau in the present study, their association with the GA does not depend on microtubules. However, these proteins differ from each other and from tau on several aspects. First, they do not share any sequence homology in their binding domain to either Golgi membranes

or microtubules. Second, they distinctly interact with microtubules and exert diverse effects on microtubule polymerization. CLIPR-59 and GMAP-210 bind to the plus and minus ends of microtubules respectively (Lallemand-Breitenbach et al. 2004; Ríos et al. 2004). CLIPR-59 exerts a depolymerizing effect on microtubules. The binding location of FTCD and Hook3 on microtubules has not been identified yet. These proteins were shown to induce tubulin polymerization but to a lower extent than tau (Bloom and Brashear 1989; Ríos et al. 2004). SCG10 belongs to a family of proteins including the ubiquitous cytosolic protein stathmin that destabilize microtubules by mainly sequestering free tubulin (Lutjens et al. 2000). Third, FTCD, SCG10, GMAP-210, CLIPR-59 and Hook3 harbor a distinct distribution on the Golgi membranes. FTCD, Hook3 and GMAP-210 are located on the cis-Golgi side whereas CLIPR-59 and SCG10 are found on the trans side. In the case of tau, our results indicate that tau concentration on the Golgi membranes increases towards the trans side of the Golgi complex. Although it is believed that FTCD, SCG10, GMAP-210, CLIPR-59 and Hook3 mediate the association of the Golgi membranes with microtubules and contribute to the positioning and morphology of the GA within a cell, the respective function of these proteins on the Golgi membranes remains to be elucidated except for GMAP-210. GMAP-210 is found on cis-Golgi membranes and binds the minus end of microtubules located at the centrosomes. In a recent study, it was shown that GMAP-210 recruits γ -tubulin complexes to the cis-Golgi membranes and this event is necessary for the pericentriolar position of the GA (Ríos et al. 2004). Alpha- and beta-tubulin were also found to be attached to the Golgi membranes

(Yamaguchi and Fukada 1995). The proteins involved in recruiting these tubulin isoforms to the Golgi membranes have not been identified yet. Tau could play such a role within a neuron.

A recent study showed that the overexpression of tau in astrocytes induced a fragmentation of the GA (Yoshiyama et al. 2003). We have also observed a fragmentation of the GA in primary hippocampal neurons transfected with human tau forms and in the JNPL3 mice expressing the mutant human form of tau P301L (Liazoghli et al. 2005). The mechanisms involved in this fragmentation of the GA by tau remain elusive. However, in previous studies, a fragmentation of the GA was consistently observed when the link between microtubules and the GA was perturbed (Lucocq et al. 1987; Lucocq and Warren 1987; Cole et al. 1996). For example, depolymerization of microtubules by nocodazole or colchicine resulted in a fragmentation of the GA (Boyd et al. 1982). Overexpression of Hook3 or GMAP-210, two proteins that mediate the interaction between microtubules and the Golgi membranes, also induced a dispersion and fragmentation of the GA (Walenta et al. 2001; Pernet-Gallay et al. 2002). Taken together, the above observations suggest that tau could be involved in the link between the Golgi membranes and microtubules and thereby could contribute to the maintenance of the GA morphology within a neuron.

Most notably, tau was not uniformly distributed on the Golgi membranes but an increase of its concentration was noted towards the trans side of the GA. The microtubule-destabilizing protein, SCG10 which is neuronal specific is also enriched on the trans side of the GA (Lutjens et al. 2000). Interestingly, the

association of SCG10 to the Golgi membranes was shown to be necessary for its targeting to the growth cones. Thus, the association of tau to the GA might be involved in its axonal sorting. On the other hand, tau might serve as a tag on vesicles emerging from the GA destined to the axonal process. Consistent with this possibility, in our subcellular fraction enriched in Golgi membranes, an important percentage of tau immunogold labeling was found on small vesicles. The trafficking pathways of the biosynthesis of integral membrane proteins is well characterized. Their synthesis occurs in the rough endoplasmic reticulum and then they go through the Golgi complex where they are packaged into carrier vesicles that will be transported either to distinct cellular compartments to deliver their contents to the plasma membrane (Van Vliet et al. 2003). Sorting of vesicles destined to different cellular compartments occurs at the TGN (Gleeson et al. 2004; Sytnyk et al. 2004). Two mechanisms seem to regulate the targeting of integral membrane proteins to the axon (Sampo et al. 2003). Some proteins are targeted both to the somato-dendritic and axonal compartment but are only retained at the plasma membrane of the axon whereas other proteins are selectively delivered to the axonal plasma membrane. In this latter case, tau could act as a axonal localization signal for the delivery of the cargo proteins to the axonal plasma membrane. Moreover, tau could remain associated with the cargo proteins after their integration to the plasma membrane since tau was found associated with this membrane.

As noted for the binding of tau to microtubules, the association of tau with membranes seems to be regulated by its phosphorylation state (Maas et al. 2000).

Indeed, the phosphorylation of tau abolished its binding to the plasma membrane in PC12 cells. The pool of tau found in the Golgi enriched subcellular fraction was phosphorylated at the sites recognized by the phospho-dependent antibody PHF-1 whereas the pool of tau found at the plasma membrane was not (Maas et al. 2000). A gradient of tau phosphorylation was observed along the axon in primary hippocampal cultures (Mandell and Banker 1996). From these data, it appears that different pools of phosphorylated tau exist along the axon which could preferentially interact with either the Golgi membranes or the plasma membrane. In degenerating neurons, tau becomes hyperphosphorylated (Lee et al. 2001). Therefore, an aberrant phosphorylation of tau might result in an alteration of its association with membranes and contribute to its dysfunction.

The detection of tau on the GA by immunogold labeling showed that tau is present in the neuronal cell body. Although most of the studies state that tau is an axonal MAP, several observations suggest that tau is also located in the cell body and dendrites. In previous studies, tau was found in the somato-dendritic compartment in adult rat brain (Papasozomenos and Binder 1987). However, its phosphorylation state differed from that in the axon. Similar results were reported in primary hippocampal neurons (Mandell and Banker 1996). In *Drosophila*, tau is also distributed in all neuronal compartments in the adult retina (Heidary and Fortini 2001). The above observations indicate that different pools of tau exist within a neuron that present a different state of phosphorylation and subcellular distribution. The function of each of these pools remain to be elucidated. This is a

crucial step to better understand the implication of tau in neuronal function and degeneration.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. M. G. Farquhar for providing the anti-mannosidase II antibody, Dr. D. Fambrough for the NaK-ATPase antibody and Dr. Virginia Lee for the polyclonal and monoclonal anti-tau antibodies. The monoclonal antibody E7 directed against β -tubulin developed by Michael Klymkowsky was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. We also thank Jean Léveillé and Annie Vallée for their excellent technical support and Dr. Moise Bendayan and Diane Gingras for helpful discussion. This work was supported by the National Sciences and Engineering Research council of Canada grant (NSERC) and by the Canadian Institute of Health Research grants (CIHR), MOP-53218 (N.L.) and MOP-44022 (J.P.). N.L. is a scholar of Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and C.A.F. and S.P. have a studentship from CRSN and M.D. a studentship from NSERC.

Bibliography

- Abi Farah C., Nguyen M., Julien J. and Leclerc N. (2003) Altered levels and distribution of microtubule-associated proteins before disease onset in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 84, 77-86.
- Abi Farah C, Liazoghli D, Perreault S, Desjardins M, Guimont A, Anton A, Lauzon M, Kreibich G, Paiement J, Leclerc N. (2004) Interaction of microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons. *J Biol Chem* epub.
- Banker G. and Goslin K. (1998) *Culturing nerve cells*, 2nd edition Edition, p 666. A Bradford Book, the MIT Press.
- Bartlett W. P. and Banker G. A. (1984a) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4, 1944-1953.
- Bartlett W. P. and Banker G. A. (1984b) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4, 1954-1965.
- Baudhuin P., Evrard P. and Berthet J. (1967) Electron microscopic examination of subcellular fractions. I. The preparation of representative samples from suspensions of particles. *J Cell Biol* 32, 181-191.
- Bloom G. S. and Brashear T. A. (1989) A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 16083-16092.
- Boyd A. E., Bolton W. E. and Brinkley B. R. (1982) Microtubules and beta cell function: effect of colchicine on microtubules and insulin secretion in vitro by mouse beta cells. *J Cell Biol.* 92, 425-434.
- Brandt R., Léger J. and Lee G. (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131, 1327 - 1340.
- Buée L., Bussiere T., Buee_Scherrer V., Delacourte A. and Hof P. R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Brain Research Reviews* 33, 95-130.
- Caceres A., Potrebic S. and Kosik K. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* 11, 1515 - 1523.
- Cole N. B., Sciaky N., Marotta A., Song J. and Lippincott-Schwartz J. (1996) Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell.* 7, 631-650.
- Dawson H., Ferreira A., Eyster M., Ghoshal N., Binder L. and Vitek M. (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* 114, 1179-1187.
- De Zeeuw D., Hoogenraad C., Goedknecht E., Hertzberg E., Neubauer A., Grosveld F. and Galjart N. (1997) CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron* 19, 1187-1199.

Dotti C. G., Sullivan C. A. and Banker G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454-1468.

Ebneth A., Godemann R., Stamer K., Illenberger S., Trinczek B. and Mandelkow E. (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143, 777 - 794.

Garcia M. L. and Cleveland D. W. (2001) Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 41-48.

Gleeson P. A., Lock J., Luke M. and Stow J. (2004) Domains of the TGN: Coats, tethers and G proteins. *Traffic* 5, 315-326.

Gonatas J., Chen Y., Stieber A., Mourelatos Z. and Gonatas N. (1998) Truncations of the C-terminal cytoplasmic domain of MG160, a medial Golgi sialoglycoprotein, result in its partial transport to the plasma membrane and filopodia. *J. Cell Sci.* 111, 249-260.

Goslin K., Birgbauer E., Banker G. and Solomon F. (1989) The role of cytoskeleton in organizing growth cones: a microfilament-associated growth cone component depends upon microtubules for its localization. *J. Cell Biol.* 109, 1621-1631.

Heidary G. and Fortini M. (2001) Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mech. Dev.* 108, 171-178.

Heins S., Song Y., Wille H., Mandelkow E. and Mandelkow E. (1991) Effect of MAP2, MAP2c and tau on kinesin-dependent microtubule motility. *J. Cell Sci.* 14, 121-124.

Jicha G., Weaver C., Lane E., Vianna C., Kress Y., Rockwood J. and Davies P. (1999) cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19, 7486 - 7494.

Jung D., Filliol D., Miche M. and Rendon A. (1993) Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP2 or tau. *Cell Motil. Cyto.* 24, 245-255.

Kempf M., Clement A., Faissner A., Lee G. and Brandt R. (1996) Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J. Neurosci.* 16, 5583-5592.

Lallemand-Breitenbach V., Quesnoit M., Braun V., El Marjou A., Poüs C., Goud B. and Perez F. (2004) CLIPR-59 is a lipid raft-associated protein containing a cytoskeleton-associated protein glycine-rich domain (CAP-Gly) that perturbs microtubule dynamics. *J Biol Chem.*

Lavoie C., Lanoix J., Kan F. and Paiement J. (1996) Cell-free assembly of rough and smooth endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 109, 1415-1425.

Lee G., Newman S., Gard D., Band H. and Panchamoorthy G. (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3167 - 3177.

Lee V., Goedert M. and Trojanowski J. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24, 1121 - 1159.

Liazoghli D., Perreault S., Micheva K., Desjardins M. and Leclerc N. (2005) Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol.* accepted

- Lucocq J. M. and Warren G. (1987) Fragmentation and partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in HeLa cells. *EMBO Journal* 6, 3239-3246.
- Lucocq J. M., Pryde J. G., Berger E. G. and Warren G. (1987) A mitotic form of the Golgi apparatus in HeLa cells. *Journal of cellular biology* 104, 865-874.
- Lutjens R., Igarashi M., Pellier V., Blasey H., Di Paolo G., Ruchti E., Pfulg C., Staple J., Catsicas S. and Grenningloh G. (2000) Localization and targeting of SCG10 to the trans-Golgi apparatus and growth cone vesicles. *Eur J Neurosci* 12, 2224 - 2234.
- Maas T., Eidenmiller J. and Brandt R. (2000) Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 275, 15733 - 15740.
- Mandell J. and Banker G. (1996) Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and the establishment of neuronal polarity. *Perspect Dev Neurobiol* 4, 125 - 135.
- Marsh B., Mastonarde D., Buttle K., Howell K. and McIntosh R. (2001) Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-115, visualized by high resolution electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2399-2406.
- Micheva K., Vallée A., Beaulieu C., Herman I. and Leclerc N. (1998) beta-Actin is confined to structures having high capacity of remodelling in developing and adult rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 10, 3785 - 3798.
- Papasozomenos S. and Binder L. (1987) Phosphorylation determines two distinct species of tau in the central nervous system. *Cell. Motil. Cyto.* 8, 210-226.
- Pernet-Gallay K., Antony C., Johannes L., Bornens M., Goud B. and Rios R. (2002) The overexpression of GMAP-210 blocks anterograde and retrograde transport between the ER and the Golgi apparatus. *Traffic* 3, 822-832.
- Peters A., Palay S. and Webster H. (1976) The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells., p 406. W.B. Saunders company.
- Rambourg A. and Clermont Y. (1990) Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol.* 51, 189-200.
- Ríos R., Sanchís A., Tassin A., Fedriani C. and Bornens M. (2004) GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell* 118, 323 - 335.
- Sampo B., Kaech S., Kunz S. and Banker G. (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37, 611-624.
- Stamer K., Vogel R., Thies E., Mandelkow E. and Mandelkow E. (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156, 1051 - 1063.
- Sytnyk V., Leshchynska I., Dityatev A. and Schachner M. (2004) Trans-Golgi network delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *J. Cell Sci.* 117, 381-388.
- Torre E. and Steward O. (1996) Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 16, 5967-5978.
- Van Vliet C., Thomas E. C., Merino-Trigo A., Teasdale R. D. and Gleeson P. A. (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 83, 1-45.

Velasco A., Hendricks L., Moremen K., Tulsiani D., Touster O. and Farquhar M. (1993) Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of alpha-mannosidase I and II. *J. Cell Biol.* 122, 39-51.

Walenta J., Didier A., Liu X. and Krämer H. (2001) The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J Cell Biol* 152, 923 - 934.

Wiedenmann B., Lawley K., Grund C. and Branton D. (1985) Solubilization of proteins from bovine brain coated vesicles by protein perturbants and triton X-100. *J. Cell Biol.* 101, 12-18.

Yamaguchi N. and Fukada M. (1995) Golgi retention mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase. Membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with alpha- and beta-tubulins. *J Biol Chem* 270, 12170-12176.

Yoshiyama Y., Zhang B., Bruce J., Trojanowski J. and Lee V. (2003) Reduction of deetyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. *J. Neurosci.* 23, 10662-10671.

Table

Table I: Quantification of the number of gold particles associated with membranes in the I2 subfraction

N=3	Number of gold particles on membranes
Control (anti-tau antibody omitted)	103
Anti-Tau-antibody (clone 49.2)	833

Figures and legends

Figure 1 Immunoblot analysis of adult rat brain subfractions.

A) Summary on the subcellular fractionation procedure. B) Fractions obtained following subcellular fractionation of adult rat brains were electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide gel (30 μ g/lane) and transferred to a nitrocellulose membrane as described in methods. A monoclonal antibody directed against tau was used (clone tau5) as well as antibodies directed against the Golgi markers mannosidase, MG160, GM130 and TGN38, the plasma membrane marker Na-K-ATPase, the endoplasmic reticulum markers, ribophorin and calnexin, tubulin and MAP2 (HM2). E: cytoplasmic extract, P: total membrane extract, S: cytosolic fraction, I: interface, RM: rough microsomes.

Figure 1 A

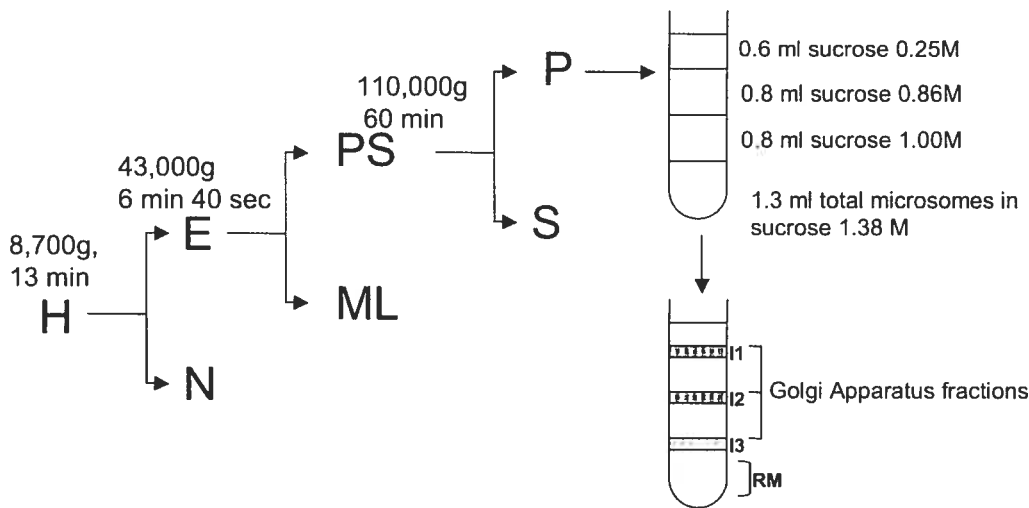


Figure 1 B

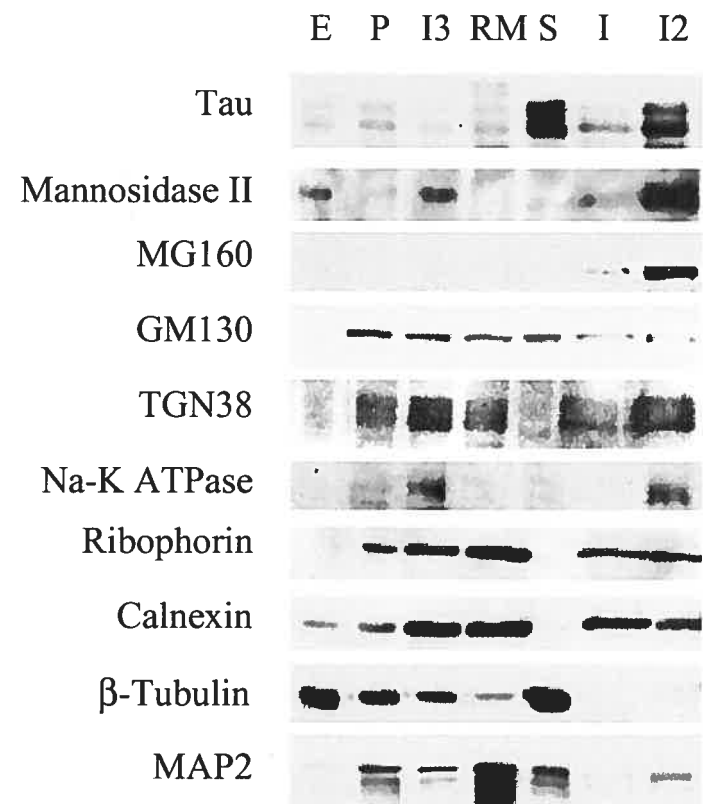


Figure 2 Electron microscopy of the I2 subfraction.

Electron micrographs of the I2 fraction. Arrowheads point to short flattened membranes which are typical of Golgi membranes. The arrows point to small vesicles (less than 100nm diameter). Scale bar: 500nm

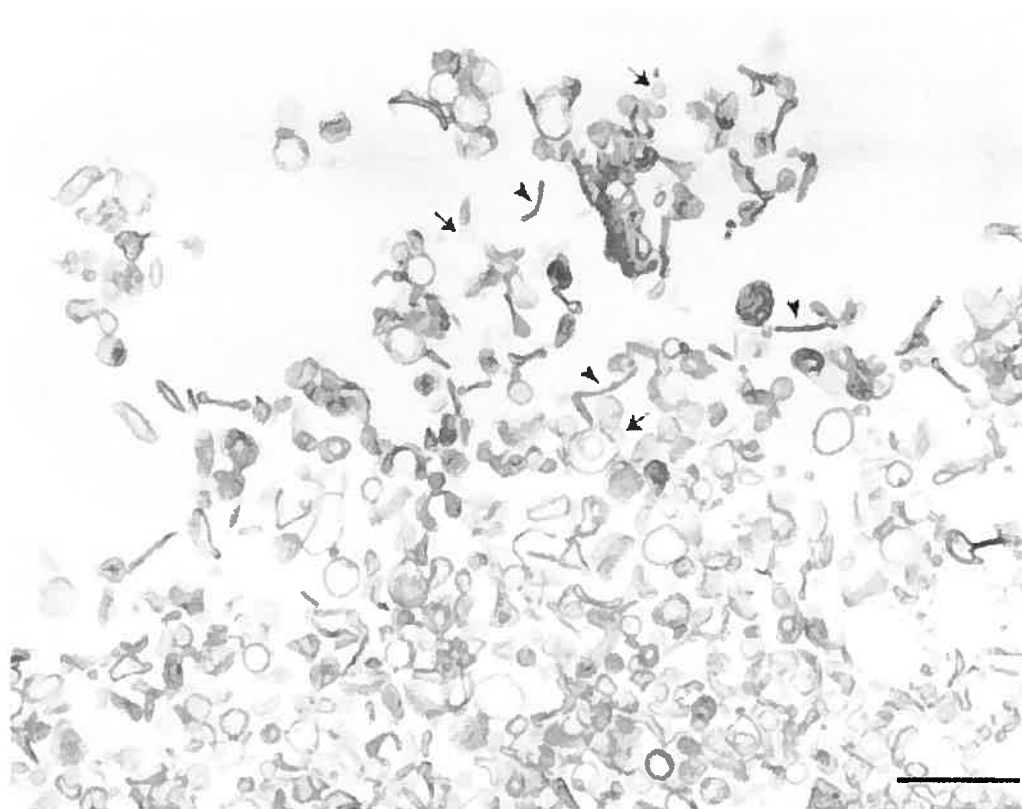
Figure 2

Figure 3 Electron microscopic immunocytochemistry of tau in the I2 subfraction.

A, B and C) A monoclonal anti-tau antibody clone 49.2 (1:200) and a polyclonal antibody directed against TGN38 were revealed using a secondary anti-mouse antibody conjugated to 10nm colloidal gold particles and a secondary anti-sheep antibody conjugated to 5nm colloidal gold particles respectively. Tau and TGN38 were found on the same short flattened membranes and vesicles. D, E and F) A monoclonal anti-tau antibody clone 49.2 (1:200) and a polyclonal antibody directed against MG160 were revealed using a secondary anti-mouse antibody conjugated to 10nm colloidal gold particles and a secondary anti-rabbit antibody conjugated to 5nm colloidal gold particles respectively. Tau and MG160 were found on the same short flattened membranes and vesicles. Scale bar: A, B, D and E= 150nm C and F=100nm

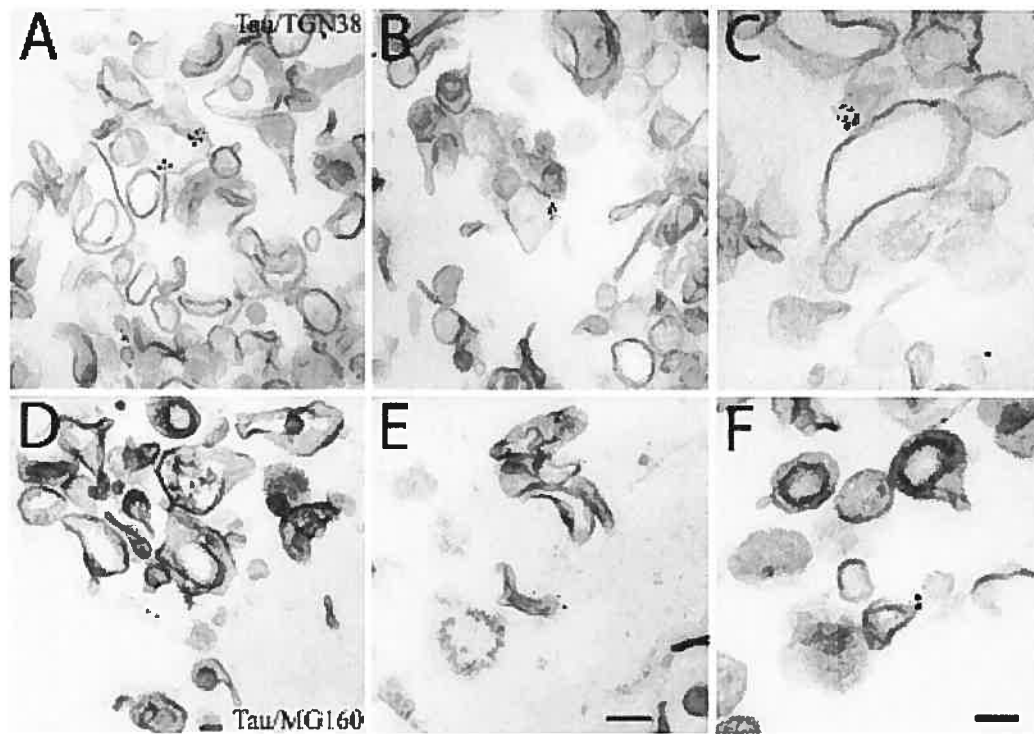
Figure 3

Figure 4 Co-immunoprecipitation of a Golgi protein complex containing MG160 with an anti-tau antibody.

A) MG160 was found in tau immunoprecipitate. On the other hand, GM130 and calnexin were only detectable at the background level. B) Western blot analysis of the I2 fraction before and following washing with sodium carbonate pH11.0 as described in methods. A little amount of tau was found in the I2 fraction following the washing step suggesting that the association of tau with the golgi apparatus is peripheral.

Figure 4A

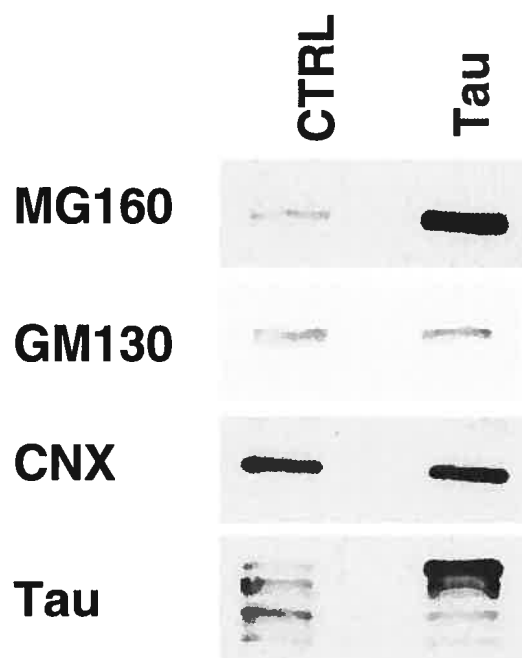


Figure 4B

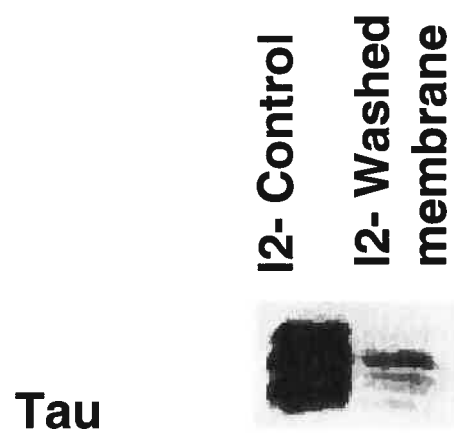


Figure 5. A partial co-localization of tau and MG160 in primary hippocampal neurons.

Primary hippocampal neurons were double-stained with an anti-tau (green) and an anti-MG160 (red) antibody. Some overlap (yellow) of the two staining was noted at the periphery of the Golgi membranes and along the neurites (overlay). Scale bar= 20 μ m

Figure 5

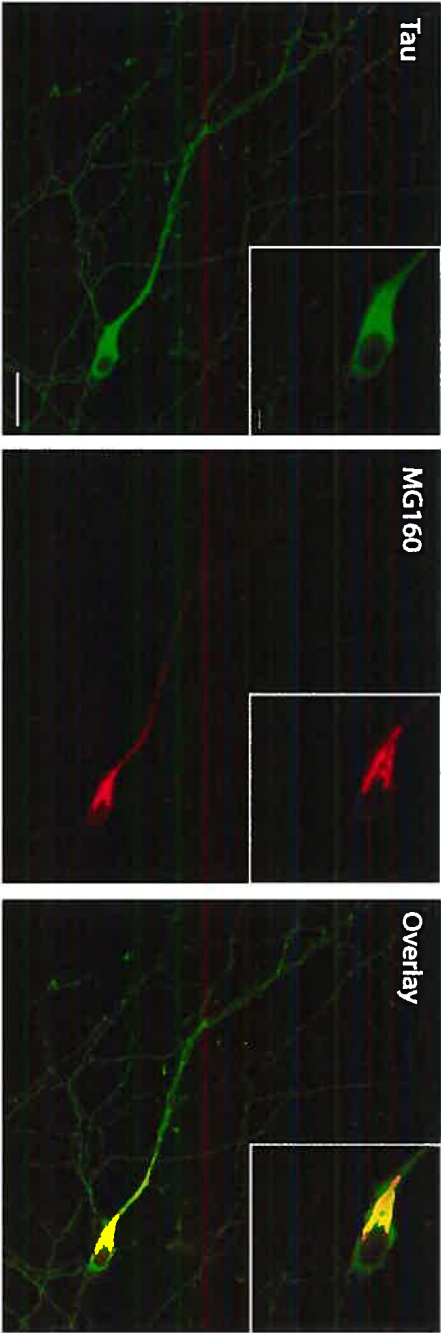


Figure 6. Electron microscopic immunocytochemistry on the sections of the spinal cord showing tau staining on microtubules.

Tau immunogold was found along the microtubules in motor neurons. Scale bar=100 nm

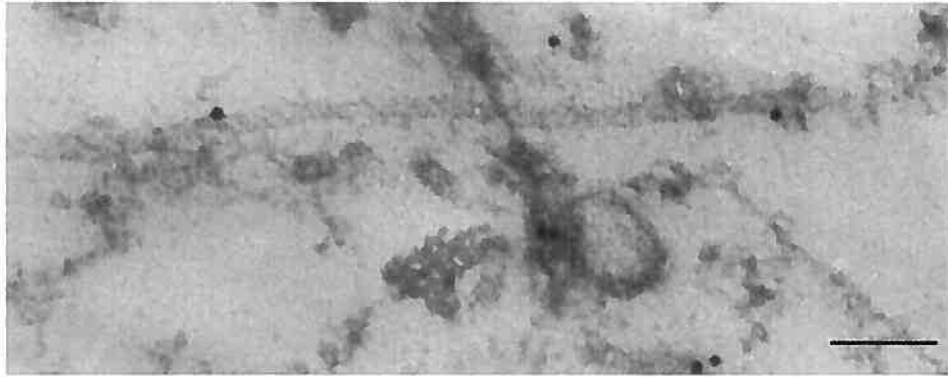
Figure 6

Figure 7. Electron microscopic immunocytochemistry on a section of a mouse spinal cord.

Tau immunogold was observed on the Golgi membranes and appeared to be more concentrated at the trans side of GA. Fenestration was used to identify the cis side of the GA and clathrin-coated vesicles to identify the trans side. Scale bar=500nm

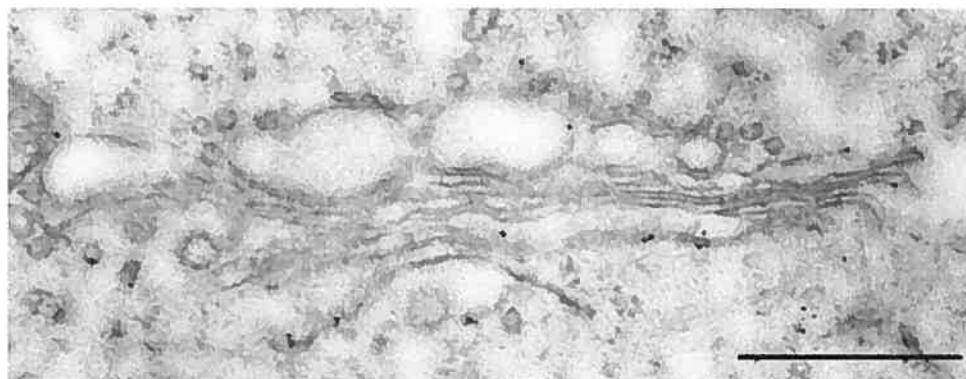
Figure 7

Figure 8. Quantitative analysis of tau immunogold on the GA membranes.

A quantitative analysis of the number of gold particles per μm^2 of membrane of the different Golgi compartments, cis, medial and trans revealed that tau was more concentrated on the trans side of the GA than on the cis side.

Figure 8

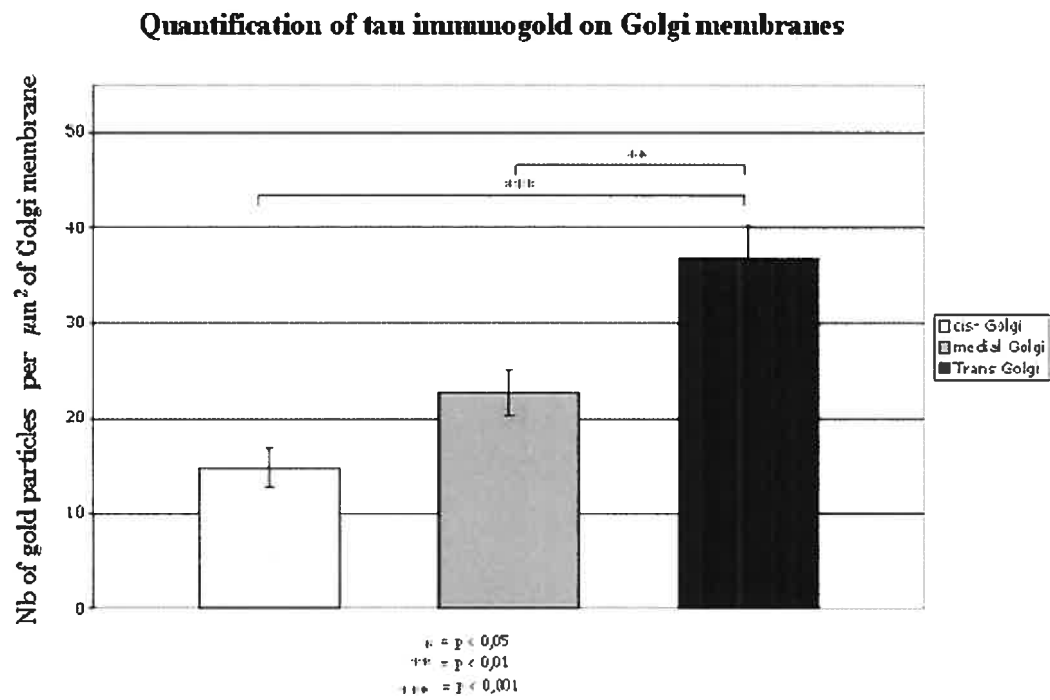
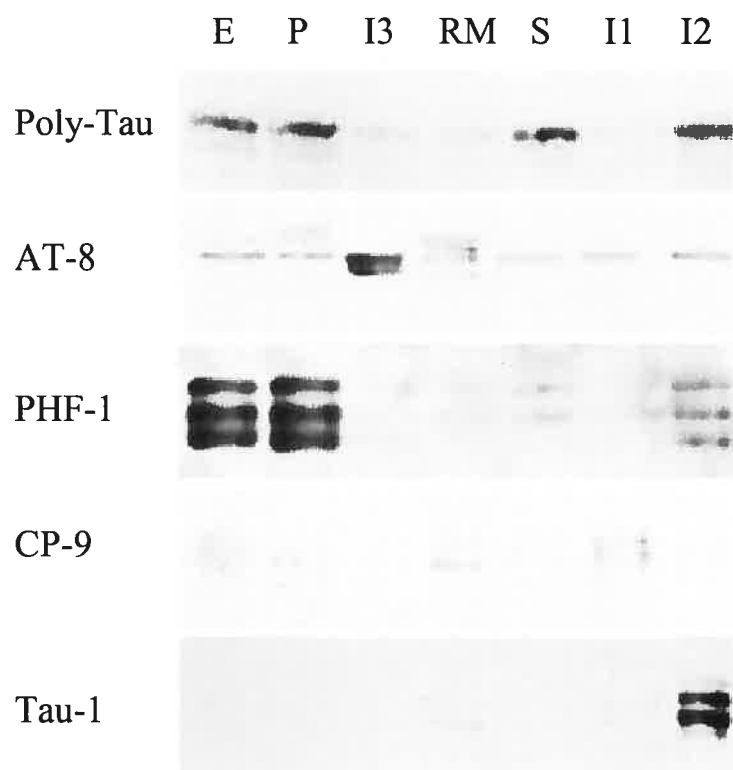


Figure 9. Immunoblot analysis of the phosphorylation state of tau in the I2 subfraction.

Fractions obtained following subcellular fractionation of adult rat brains were electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide gel (30 µg/lane) and transferred to a nitrocellulose membrane as described in methods. The subcellular fractions were analysed by using the tau phosphorylation-sensitive antibodies PHF-1, AT-8 and CP9 and the antibody Tau-1 directed against unphosphorylated tau. A polyclonal antibody directed against tau was used to reveal total tau. E: cytoplasmic extract, P: total membrane extract, S: cytosolic fraction, I: interface, RM: rough microsomes.

Figure 9

Chapitre troisième

Discussion

Nos travaux ont révélé une association insoupçonnée entre l'appareil de Golgi et la protéine tau. Nous avons caractérisé cette interaction grâce à des techniques de microscopie confocale, de co-immunoprécipitation et de fractionnement subcellulaire. De plus, l'immunocytochimie en microscopie électronique sur des coupes de la moelle épinière a démontré que la protéine tau est concentrée dans les sous compartiments médial et trans de l'appareil de Golgi. En effet, la quantification de la distribution du marquage à l'or colloïdal a révélé que tau suit un gradient de distribution croissant du compartiment cis- au compartiment trans- de l'appareil de Golgi. La densité des billes d'or dans la partie trans-golgienne est en effet presque trois fois plus importante que dans la partie cis-golgienne alors que le marquage du compartiment médial se situe à mi-chemin entre les deux. Cette distribution polarisée de tau dans l'appareil de Golgi suggère que la protéine joue un rôle précis dans la fonction et la structure de cet organe. De telles données ouvrent une nouvelle voie dans la compréhension des mécanismes cellulaires responsables de la neurodégénérescence.

I Fonction probable de l'interaction de tau et de l'appareil de Golgi

I.1 Maintien de la morphologie de l'appareil de Golgi

La protéine tau possède deux domaines fonctionnels principaux : un domaine de liaison aux microtubules, le domaine C-terminal, et un domaine N-terminal qui se projette à la surface des microtubules. Bien que cette hypothèse reste à confirmer, il est probable que l'interaction entre la protéine tau et les

membranes golgiennes implique le domaine de projection. Ce domaine, déjà connu pour son interaction avec la membrane plasmique, permettrait à la protéine tau de s'associer aux membranes golgiennes tout en étant liée aux microtubules. Tau pourrait donc ancrer et stabiliser les membranes golgiennes aux microtubules. Cette association pourrait jouer un rôle important du fait que les microtubules contribuent à la structure et au fonctionnement de l'appareil de Golgi.

D'autres protéines associées aux microtubules incluant FTCD, SCG10, GMAP-210, CLIPR59 et Hook3 sont d'ailleurs associées à l'appareil de Golgi (Bloom and Brashear 1989; Lutjens et al., 2000; Walenta et al., 2001; Lallemand et al., 2004; Rios et al., 2004). Ces protéines associées aux microtubules se distinguent cependant de tau par leurs séquences de liaison aux microtubules et à l'appareil de Golgi. La protéine Hook3, par exemple, possède un domaine NH(2)-terminal qui médie l'attachement aux microtubules et un domaine COOH-terminal qui s'associe aux membranes golgiennes (Walenta et al., 2001). D'autre part, alors que tau s'associe à la partie latérale des microtubules, les protéines CLIP-59 et GMAP-210 se lient à leurs extrémités (Lallemand-Breitenbach et al., 2004; Rios et al., 2004). De plus alors que les protéines FTCD et Hook3 favorisent la polymérisation des microtubules comme tau, SCG10 induit plutôt une déstabilisation des microtubules (Bloom and Brashear 1989; Rios et al., 2004; Lutjens et al., 2000). Malgré ces différences, il existe plusieurs similitudes entre ces protéines et tau. En effet, tout comme pour la protéine tau, leur association est indépendante des microtubules. Par ailleurs, ces protéines associées aux microtubules possèdent une distribution particulière à l'intérieur même des

compartiments golgiens. En effet, alors que FTCD, Hook3 et GMAP-210 sont enrichies dans la partie cis de l'appareil de Golgi, CLIPR-59 et SCG10 sont plutôt concentrées du côté trans comme la protéine tau. Le rôle de la plupart de ces protéines reste à clarifier, mais plusieurs faits expérimentaux laissent croire qu'elles contribuent à une association avec les membranes golgiennes et donc à la structure et la localisation intracellulaire de l'appareil de Golgi. GMAP-210 positionnerait notamment l'appareil de Golgi en relation avec les centrosomes en s'associant à la tubuline- γ et aux membranes golgiennes (Rios et al., 2004). Les formes α et β de la tubuline se trouvent également à la surface des membranes golgiennes, mais les protéines associées aux microtubules responsables de cette interaction n'ont toujours pas été identifiées (Yamaguchi and Fukada 1995). Tau pourrait jouer ce rôle en établissant un pont entre les membranes golgiennes et ces formes de tubuline et contribuer ainsi à la stabilisation de l'appareil de Golgi.

I.2 Implication de tau dans la polarité neuronale

Dans des cellules polaires comme que les neurones, des mécanismes hautement régulés sont nécessaires afin d'acheminer les protéines membranaires vers le bon compartiment. L'association entre la protéine tau et les membranes golgiennes pourrait contribuer au ciblage de la protéine vers l'axone. La protéine déstabilisatrice des microtubules, SCG10, elle aussi enrichie dans le compartiment trans-golgien, doit d'ailleurs être associée à l'appareil de Golgi pour être dirigée adéquatement vers le cône de croissance (Lutjens et al., 2000).

Par ailleurs, en plus de contribuer à sa propre localisation, tau pourrait participer au ciblage des protéines membranaires vers l'axone. L'enrichissement axonal de la protéine tau, son association aux microtubules et sa localisation préférentielle sur la face trans-golgienne lui confèrent une position idéale pour participer à ce processus. C'est en effet dans les citernes trans et le réseau trans golgien « TGN » que sont formées les vésicules qui contiennent les protéines membranaires ayant transité par l'appareil de Golgi et destinées aux différents compartiments cellulaires (Van Vliet et al., 2003; Gleeson et al., 2004; Sytnyk et al., 2004). L'immunocytochimie en microscopie électronique sur la fraction golgienne I2 et sur les motoneurones de la moelle épinière montre d'ailleurs un marquage de tau sur de petites vésicules. La protéine tau retrouvée à la surface des vésicules pourrait être une « étiquette » reconnue par un mécanisme de ciblage qui dirige adéquatement le cargo vers l'axone. Le transport actif de ces vésicules serait assuré par les protéines motrices kinésines et dynéines. D'autres protéines associées aux microtubules contribuent d'ailleurs au ciblage d'éléments membranaires. Ainsi, il a été démontré qu'un membre de la famille des CLIPs, la CLIP-115, participe à la ségrégation des corps lamellaires dans les dendrites (De Zeeuw et al., 1997). D'autre part, nous avons récemment observé au laboratoire une possible implication de la protéine associée aux microtubules dendritiques, MAP2, dans la distribution somato-dendritique de réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Abi Farah et al., 2004). Ainsi, MAP2 participerait au ciblage des membranes du réticulum vers les dendrites et tau pourrait participer à celui des membranes golgiennes vers l'axone.

II Nature de l'interaction entre la protéine tau et l'appareil de Golgi

II.1 La protéine tau associée à l'appareil de Golgi est phosphorylée

L'existence d'une interaction entre l'appareil de Golgi et la protéine tau va à l'encontre du « dogme » actuel au sujet de cette protéine. En effet, tau est considérée par plusieurs chercheurs comme une protéine essentiellement axonale et associée aux microtubules (Binder et al., 1985). Or, l'appareil de Golgi est un organe somatique et dendritique, même si des vésicules golgiennes sont transportées dans l'axone, l'appareil de Golgi est absent ces prolongements. L'interaction entre la protéine tau et l'appareil de Golgi est donc inattendue. Des études démontrent cependant que tau est présent non seulement dans l'axone, mais aussi dans le compartiment somato-dendritique (Papasozomenos et al., 1987; Litman et al., 1993). Nos observations en microscopie confocale confirment ces observations antérieures et indiquent que la protéine tau est présente dans le corps cellulaire ainsi que les dendrites des neurones. La protéine tau localisée dans ce compartiment pourrait correspondre à des sous classes de la protéine déterminées par leur état de phosphorylation.

L'analyse biochimique des fractions subcellulaires a montré que la majeure partie de la protéine tau retrouvée dans la fraction golgienne I2 présente un état de phosphorylation spécifique. En effet, l'anticorps phosphodépendant, PHF-1, qui reconnaît les sites phosphorylés Ser396 et Ser404 révèle un enrichissement de la fraction I2 comparativement aux anticorps de tau, CP9 et AT-

8, qui reconnaissent d'autres sites de phosphorylation. Par ailleurs, la fraction cytosolique (S), riche en tubuline, contient peu de tau phosphorylée, ce qui suggère que cette sous-population de la protéine n'est pas associée aux microtubules, mais bien aux membranes. Ces observations corroborent les données présentées par Maas et al. (2000), qui démontrent que la protéine tau phosphorylée reconnue par l'anticorps PHF-1 est enrichie dans une fraction membranaire. Ce faisant, elles soulignent également l'importance de la phosphorylation de tau dans la régulation de son association aux membranes. En effet, dans l'étude de ces auteurs, la sous population de tau associée à la membrane plasmique n'était pas phosphorylée aux sites reconnus par l'anticorps PHF-1. La phosphorylation de certains sites change la conformation de la protéine et modifie son affinité pour différents substrats. Dans le cas de l'interaction de tau avec les membranes golgiennes, il semble que les sites Ser 396 et Ser 404 jouent un rôle important.

II.2 Complexes protéiques pouvant médier l'interaction de tau avec les membranes golgiennes

Le type d'interaction entre les membranes golgiennes et la protéine tau reste à déterminer. Cependant, plusieurs données suggèrent que cette association est plutôt de type périphérique. En effet, puisque tau n'est pas une protéine qui transite normalement par l'appareil de Golgi, une distribution à l'intérieur de l'appareil de Golgi serait surprenante. Le marquage de tau à l'or colloïdal n'est d'ailleurs pas trouvé à l'intérieur des saccules et montre plutôt une distribution membranaire. D'autre part, la diminution importante de tau dans la fraction golgienne par suite du lavage des membranes avec le carbonate sodique pH 11,0

confirme que l'association de tau aux membranes golgiennes est de type périphérique. La protéine tau ne fait donc pas partie des protéines intégrales de l'appareil de Golgi, mais s'associe plutôt à la face externe des membranes golgiennes.

L'association entre la protéine tau et l'appareil de Golgi doit donc être assurée par un complexe de protéines intégrales ou périphériques de la membrane golgienne. Bien que nous n'ayons pas encore identifié les partenaires impliqués dans cette interaction, deux protéines, la spectrine et la préséline-1, pourraient faire partie de ce complexe. On sait, en effet, que ces deux protéines ont la capacité de se lier à la protéine tau et qu'elles sont présentes dans l'appareil de Golgi. D'abord caractérisées dans les érythrocytes, les nombreuses isoformes de la spectrine se retrouvent dans tous les types cellulaires. Cette protéine contribue notamment au maintien ainsi qu'à la distribution des organelles en interagissant avec les filaments d'actine. Plus précisément, la spectrine β III est associée à l'appareil de Golgi où l'on suppose qu'elle participe aux mécanismes de ségrégation et de ciblage (Stankewich et al., 1998). De leur côté, Carlier et al. (1984) ont démontré que tau peut lier directement la spectrine. La spectrine β III est donc une excellente candidate pour faire partie du complexe liant tau à l'appareil de Golgi. D'ailleurs, ces deux protéines présentent une distribution golgienne périphérique similaire en microscopie à fluorescence (Stankewich et al., 1998). La préséniline-1, PS-1, pourrait également faire partie du complexe protéique qui lie tau aux membranes golgiennes. Cette protéine participe à la protéolyse du précurseur du β -amyloïde (β -APP), une protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Les patients atteints

d'une mutation du gène de la PS-1 développent d'ailleurs une forme précoce de la maladie d'Alzheimer (Lleo et al., 2004). La PS-1 est présente dans le réticulum endoplasmique, mais également dans l'appareil de Golgi (Kovacs et al., 1996; Xia et al., 1998). Il a été démontré que PS-1 est associée à un complexe formé par la protéine tau et la kinase GSK3- β (Takashima et al., 1998). La liaison de PS-1 à GSK3- β augmenterait la phosphorylation de tau. Cette association pourrait expliquer à la fois la distribution tau sur la face trans golgienne et la phosphorylation de tau.

III Perturbation de l'association entre tau et l'appareil de Golgi et possible implication dans la neurodégénérescence

III.1 Altération de la distribution de la protéine tau

Dans les conditions pathologiques où l'on observe une dérégulation des modifications post-traductionnelles de tau, l'association entre tau et l'appareil de Golgi pourrait être perturbée. L'analyse quantitative de la distribution de la protéine tau chez les souris transgéniques JNPL3, un modèle de tauopathie, semble confirmer cette hypothèse (résultats non présentés). En effet, la quantité de tau diminue dans la fraction enrichie en protéines golgiennes alors qu'elle augmente dans le réticulum endoplasmique. Papazomenos et al. (1989) avaient déjà d'ailleurs rapporté que tau s'accumulait sur les ribosomes dans les neurones de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. En plus de compromettre la fonction de tau dans l'appareil de Golgi, cette perturbation pourrait induire un

stress cellulaire important. L'accumulation de tau dans le réticulum endoplasmique pourrait notamment provoquer une libération du Ca^{2+} intracellulaire, un des processus impliqués dans la mort neuronale. De plus, cette concentration anormale de tau dans le réticulum endoplasmique pourrait favoriser la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires. Hall et al. (2000) ont notamment observé que les filaments de tau forment des agrégats avec les microtubules et le réticulum endoplasmique.

III.2 Altération de la structure de l'appareil de Golgi

Plusieurs études ont montré une redistribution structurale de l'appareil de Golgi dans des conditions pathologiques où l'on retrouve une dysfonction de la protéine tau. Une fragmentation de l'appareil de Golgi a été rapportée dans la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Creutzfeldt-Jakob, ainsi que dans l'atrophie multisystémique (Gonatas et al., 1998; Sakurai et al., 2000; 2002). Cette altération de la structure de l'appareil de Golgi s'observe aisément en microscopie optique et plusieurs chercheurs la considèrent comme un signe de neurodégénérescence. Lorsque l'appareil de Golgi est fragmentée, sa structure tubulaire et interconnectée est abolie et les membranes golgiennes sont dispersées à travers le cytoplasme sous forme de petites vésicules rondes.

Cette fragmentation a également pu être reproduite dans des modèles de culture cellulaire. Yoshiyama et al. (2003) ont observé une fragmentation de l'appareil de Golgi dans des astrocytes en culture qui surexprimaient la protéine

tau humaine. Dans notre laboratoire, nous avons également constaté un phénotype similaire dans les neurones en culture surexprimant tau et différentes formes humaines mutantes de la protéine (Liazoghli et al., 2005). De plus, nous avons montré que cette fragmentation de l'appareil de Golgi est présente dans les motoneurones de la moelle épinière de souris JNPL3 surexprimant la forme mutante P301L de la protéine tau humaine. Cette perturbation de la structure de l'appareil de Golgi se produirait précocément au cours du processus de neurodégénérescence. En effet, chez les souris transgéniques, nous avons été en mesure d'observer des neurones avec une fragmentation de l'appareil de Golgi avant même la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires et l'apparition de symptômes majeurs (Liazoghli et al., 2005). Ainsi, une perturbation des mécanismes de régulation de la synthèse et de la phosphorylation de tau semble suffisante pour induire une altération significative de la morphologie des membranes golgiennes. La surexpression des protéines associées aux microtubules et connues pour leur interaction avec l'appareil de Golgi, Hook-3 et GMAP-210, induit par ailleurs une dispersion et une fragmentation de l'appareil de Golgi (Walenta et al., 2001; Pernet-Gallay et al., 2002). Ces observations supportent l'hypothèse voulant que les protéines associées aux microtubules jouent un rôle important dans le maintien des membranes golgiennes.

Même si les mécanismes responsables de la fragmentation de l'appareil de Golgi sont encore hypothétiques, tau semble impliquée dans ce processus, par suite d'une perturbation de l'interaction entre tau et les membranes golgiennes, d'un effondrement des microtubules, ou d'une perturbation du transport entre

l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. La perturbation de l'interaction entre l'appareil de Golgi et les microtubules pourrait être suffisante pour induire la fragmentation des membranes golgiennes. En effet, la fonction d'ancrage de la protéine tau serait alors altérée et la stabilisation des membranes golgiennes grandement compromise. Cette perturbation pourrait éventuellement conduire à une réorganisation importante des membranes, telle qu'observée dans la fragmentation de l'appareil de Golgi. La fragmentation de l'appareil de Golgi pourrait également être causée par l'effondrement du réseau microtubulaire. Ce phénomène peut d'ailleurs être observé par suite du traitement de neurones en culture avec le nocodazole (Thyberg and Moskalewski, 1999). Cette drogue induit une dépolymérisation massive des microtubules. Dans les neurones, une perturbation de la fonction stabilisatrice de tau auprès des microtubules pourrait conduire à l'altération de la morphologie des membranes golgiennes et ainsi contribuer à la fragmentation de l'appareil de Golgi. Cependant, nous n'avons pas observé de perturbation majeure du réseau microtubulaire dans les neurones en culture et de la moelle épinière où l'on retrouvait une fragmentation de l'appareil de Golgi (Liazoghli et al., 2005). Par contre, la fragmentation de l'appareil de Golgi peut être induite par une perturbation du transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. En effet, les drogues qui bloquent le transport entre ces deux organites induisent ce phénotype particulier (Toshiyuki et al., 1988). Le transport kinésine dépendant qui assure l'acheminement des vésicules entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique est d'ailleurs affecté lorsqu'on surexprime tau (Mandelkow et al., 2003; Ebner et al., 1998;

Stamer et al., 2002). Une altération du transport entre les deux organites pourrait donc contribuer la fragmentation de l'appareil de Golgi.

III.3 Conséquences fonctionnelles de la perturbation de l'association de tau et de l'appareil de Golgi

Le changement de distribution de la protéine tau ainsi que la fragmentation de l'appareil de Golgi pourraient gravement affecter le fonctionnement de cet organe. La modification post-traductionnelle et le ciblage des protéines membranaires seraient alors compromis. Ces perturbations favoriseraient notamment l'accumulation de protéines qui transitent par l'appareil de Golgi, comme la protéine APP. En effet, la transformation de cette protéine s'effectue au sein de l'appareil de Golgi, dans le compartiment trans golgien, avant son ciblage vers la membrane plasmique (Tomita et al., 1998). L'augmentation de la quantité totale d'APP peut avoir des conséquences désastreuses pour le neurone, puisqu'elle favorise le clivage de cette protéine en β -amyloïde neurotoxique (Xy et al., 1997). Nos observations montrent d'ailleurs une augmentation de la quantité d'APP chez les souris transgéniques JNPL3 surexprimant la protéine tau humaine (résultats non présentés). En effet, on note que l'APP s'accumule dans les fractions correspondant aux membranes golgiennes et au réticulum endoplasmique. Cette augmentation de la quantité du précurseur du β -amyloïde a d'ailleurs été observée dans des cultures neuronales où l'on induit une surexpression de la protéine tau (Stamer et al., 2002). Dans leur étude, ces auteurs suggèrent que cette perturbation est le résultat d'une inhibition du transport kinésine dépendant, par suite de compétition pour les sites de liaison aux microtubules. Une altération de la

structure du Golgi ou du ciblage des protéines destinées au compartiment axonal pourrait induire un effet similaire.

L'accumulation intracellulaire d'APP favorisant la formation de β -amyloïde pourrait donc expliquer les deux anomalies neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, soit les dépôts de β -amyloïde et la présence des enchevêtrements neurofibrillaires composés de tau. Ces deux types d'agrégats protéiques sont souvent considérés comme des éléments indépendants. Advenant que notre hypothèse se vérifie, elle permettrait d'établir un lien logique entre les deux processus et ainsi réconcilier deux grands courants de pensée.

IV Conclusion

Notre étude montre une nouvelle association entre tau et l'appareil de Golgi. Cette interaction périphérique concerne essentiellement la face médiale et trans-golgienne. D'autre part, la protéine tau associée aux membranes golgiennes présente un état de phosphorylation spécifique et distinct de celui de la protéine liée aux microtubules ou à la membrane plasmique. Finalement, les observations présentées dans cette étude et celles qui concernent la fragmentation de l'appareil de Golgi suggèrent qu'une dysfonction de la protéine tau pourrait affecter son association aux membranes golgiennes et perturber la morphologie de cet organe vital. Au cours des prochains mois, nous déterminerons quels sont les partenaires impliqués dans le complexe d'association de tau à l'appareil de Golgi, grâce à différentes approches biochimiques. Par ailleurs, nous chercherons à élucider le rôle de la protéine tau associée aux membranes golgiennes grâce à des reconstitutions *in vitro*. Nous évaluerons également les conséquences d'une altération de la fonction de tau sur l'activité sécrétrice de l'appareil de Golgi et le transport de l'APP. La mise en évidence de l'interaction entre la protéine tau et le Golgi soulève de nombreuses interrogations et perspectives de recherche que nous tenterons d'explorer.

Bibliographie

- Abi Farah C, Liazoghli D, Perreault S, Desjardins M, Guimont A, Anton A, Lauzon M, Kreibich G, Paiement J, Leclerc N. (2004) Interaction of microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons. *J Biol Chem* epub.
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 22:9340-9351.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P (2003) Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* 86:582-590.
- Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271:28741-28744.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84:361-384.
- Baudier J, Cole RD (1987) Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem* 262:17577-17583.
- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336:417-424.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-163.
- Billingsley ML, Kincaid RL (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 323 (Pt 3):577-591.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Bloom GS, Brashear TA (1989) A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules. *J Biol Chem* 264:16083-16092.
- Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging* 16:479-486.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10:1089-1099.
- Brandt R, Lee G (1993) Functional organization of microtubule-associated protein tau.

Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J Biol Chem* 268:3414-3419.

Brandt R, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.

Brion JP, Tremp G, Octave JN (1999) Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 154:255-270.

Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.

Buee Scherrer V, Hof PR, Buee L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, Olanow CW, Delacourte A (1996) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 91:351-359.

Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115:717-730.

Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463.

Caceres A., Potrebic S. and Kosik K. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* 11, 1515 - 1523.

Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA (1984) Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 66:305-311.

Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J (1996) The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 271:32789-32795.

Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Pous C (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell* 12:2047-2060.

Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360:674-677.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207-225.

Colanzi A, Suetterlin C, Malhotra V (2003) Cell-cycle-specific Golgi fragmentation: how and why? *Curr Opin Cell Biol* 15:462-467.

Conrad C, Vianna C, Freeman M, Davies P (2002) A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7751-7756.

Cornea-Hebert V, Watkins KC, Roth BL, Kroeze WK, Gaudreau P, Leclerc N, Descarries L (2002) Similar ultrastructural distribution of the 5-HT(2A) serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. *Neuroscience* 113:23-35.

Crowther RA, Olesen OF, Smith MJ, Jakes R, Goedert M (1994) Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein. *FEBS Lett* 337:135-138.

Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron*

40:471-483.

DiTella M, Feiguin F, Morfini G, Caceres A (1994) Microfilament-associated growth cone component depends upon Tau for its intracellular localization. *Cell Motil Cytoskeleton* 29:117-130.

Dotti CG, Banker GA, Binder LI (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23:121-130.

Drubin D, Kobayashi S, Kirschner M (1986) Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann N Y Acad Sci* 466:257-268.

Duff K, Knight H, Refolo LM, Sanders S, Yu X, Picciano M, Malester B, Hutton M, Adamson J, Goedert M, Burki K, Davies P (2000) Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* 7:87-98.

Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777-794.

Ferreira A, Busciglio J, Caceres A (1989) Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau. *Brain Res Dev Brain Res* 49:215-228.

Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988) Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263:18545-18552.

Garcia Rocha M, Avila J (1995) Characterization of microtubule-associated protein phosphoisoforms present in isolated growth cones. *Brain Res Dev Brain Res* 89:47-55.

Garver TD, Harris KA, Lehman RA, Lee VM, Trojanowski JQ, Billingsley ML (1994) Tau phosphorylation in human, primate, and rat brain: evidence that a pool of tau is highly phosphorylated in vivo and is rapidly dephosphorylated in vitro. *J Neurochem* 63:2279-2287.

Gleeson PA, Lock JG, Luke MR, Stow JL (2004) Domains of the TGN: coats, tethers and G proteins. *Traffic* 5:315-326.

Goedert M (2003) Neurodegenerative tauopathy in the worm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9653-9655.

Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4051-4055.

Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8:393-399.

Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 9:4225-4230.

Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992a) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1983-1987.

Goedert M, Cohen ES, Jakes R, Cohen P (1992b) p42 MAP kinase phosphorylation sites in

microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease [corrected]. *FEBS Lett* 312:95-99.

Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383:550-553.

Goedert M, Crowther RA, Spillantini MG (1998) Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21:955-958.

Gonatas NK, Gonatas JO, Stieber A (1998) The involvement of the Golgi apparatus in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, and ricin intoxication. *Histochem Cell Biol* 109:591-600.

Gotz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, Burki K, Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 14:1304-1313.

Hall GF, Chu B, Lee G, Yao J (2000) Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci* 113 (Pt 8):1373-1387.

Ham A. W. (1974) The Golgi Apparatus p. 125. *Histology*, Seventh Edition, Lippincott

Hamre KM, Hyman BT, Goodlett CR, West JR, Van Hoesen GW (1989) Alz-50 immunoreactivity in the neonatal rat: changes in development and co-distribution with MAP-2 immunoreactivity. *Neurosci Lett* 98:264-271.

Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62.

Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488-491.

Heins S., Song Y., Wille H., Mandelkow E. and Mandelkow E. (1991) Effect of MAP2, MAP2c and tau on kinesin-dependent microtubule motility. *J. Cell Sci.* 14, 121-124.

Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9:1381-1388.

Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107:1449-1459.

Holzer M, Holzapfel HP, Zedlick D, Bruckner MK, Arendt T (1994) Abnormally phosphorylated tau protein in Alzheimer's disease: heterogeneity of individual regional distribution and relationship to clinical severity. *Neuroscience* 63:499-516.

Hong M, Lee VM (1997) Insulin and insulin-like growth factor-I regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem* 272:19547-19553.

Hong DH, Forstner JF, Forstner GG (1997) Protein kinase C-epsilon is the likely mediator of mucin exocytosis in human colonic cell lines. *Am J Physiol* 272:G31-37.

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty

S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Heutink P, et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702-705.

Hwang SC, Jhon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG (1996) Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 271:18342-18349.

Ikegami S, Harada A, Hirokawa N (2000) Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett* 279:129-132.

Ingram EM, Spillantini MG (2002) Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends Mol Med* 8:555-562.

Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24:751-762.

Jackson GR, Wiedau-Pazos M, Sang TK, Wagle N, Brown CA, Massachi S, Geschwind DH (2002) Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34:509-519.

Jancsik V, Filliol D, Felter S, Rendon A (1989) Binding of microtubule-associated proteins (MAPs) to rat brain mitochondria: a comparative study of the binding of MAP2, its microtubule-binding and projection domains, and tau proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 14:372-381.

Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L, Jr., Hoffmann R, Davies P (1997) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 69:2087-2095.

Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 399:344-349.

Kanai Y, Chen J, Hirokawa N (1992) Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J* 11:3953-3961.

Kandel E.R, J. H. Schwartz J. H., Jessel T.M. (2000) Structure of a neuron p. 22. *Principles of Neural Science*, Fourth Edition, McGraw-Hill

Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 22:70-77.

Kenessey A, Yen SH (1993) The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res* 629:40-46.

Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-193.

Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.

Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W (1996) Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 2:224-229.

- Lallemand-Breitenbach V, Quesnoit M, Braun V, El Marjou A, Pous C, Goud B, Perez F (2004) CLIPR-59 is a lipid raft-associated protein containing a cytoskeleton-associated protein glycine-rich domain (CAP-Gly) that perturbs microtubule dynamics. *J Biol Chem* 279:41168-41178.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2:1615-1624.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21):3167-3177.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121-1159.
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML (2003) Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1619:167-176.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25:402-405.
- Liazoghli D., Perreault S., Micheva K., Desjardins M. and Leclerc N. (2005) Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol.* 166: 1499-514.
- Ling Y, Morgan K, Kalsheker N (2003) Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1505-1535.
- Litersky JM, Johnson GV (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267:1563-1568.
- Litman P, Barg J, Rindzoonski L, Ginzburg I (1993) Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* 10:627-638.
- Liu WK, Yen SH (1996) The state of phosphorylation of normal adult brain tau, fetal tau, and tau from Alzheimer paired helical filaments at amino acid residue Ser262. *J Neurochem* 66:1131-1139.
- Lleo A, Berezovska O, Growdon JH, Hyman BT (2004) Clinical, pathological, and biochemical spectrum of Alzheimer disease associated with PS-1 mutations. *Am J Geriatr Psychiatry* 12:146-156.
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8422-8426.
- Lovestone S, Hartley CL, Pearce J, Anderton BH (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73:1145-1157.
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399:784-788.
- Lutjens R, Igarashi M, Pellier V, Blasey H, Di Paolo G, Ruchti E, Pfulg C, Staple JK, Catsicas S, Grenningloh G (2000) Localization and targeting of SCG10 to the trans-Golgi apparatus and growth cone vesicles. *Eur J Neurosci* 12:2224-2234.

- Maas T, Eidenmuller J, Brandt R (2000) Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 275:15733-15740.
- Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8:425-427.
- Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* 314:315-321.
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E (2003) Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24:1079-1085.
- Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13:989-1002.
- Mawal-Dewan M, Henley J, Van de Voorde A, Trojanowski JQ, Lee VM (1994) The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem* 269:30981-30987.
- Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1997) Selective destruction of stable microtubules and axons by inhibitors of protein serine/threonine phosphatases in cultured human neurons. *J Neurosci* 17:5726-5737.
- Metuzals J, Robitaille Y, Houghton S, Gauthier S, Kang CY, Leblanc R (1988) Neuronal transformations in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* 252:239-248.
- Nishimura I, Yang Y, Lu B (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* 116:671-682.
- Papasozomenos SC (1989) Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type: II. Electron microscopy and pathogenetic implications. Effects of fixation on the morphology of the Alzheimer's abnormal filaments. *Lab Invest* 60:375-389.
- Papasozomenos SC (1997) The heat shock-induced hyperphosphorylation of tau is estrogen-independent and prevented by androgens: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6612-6617.
- Papasozomenos SC, Binder LI (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton* 8:210-226.
- Pernet-Gallay K, Antony C, Johannes L, Bornens M, Goud B, Rios RM (2002) The overexpression of GMAP-210 blocks anterograde and retrograde transport between the ER and the Golgi apparatus. *Traffic* 3:822-832.
- Probst A, Gotz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Burki K, Goedert M (2000) Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 99:469-481.
- Rickard JE, Kreis TE (1996) CLIPs for organellemicrotubule interactions. *Trends Cell Biol* 6:178-183.
- Rios RM, Sanchis A, Tassin AM, Fedriani C, Bornens M (2004) GMAP-210 recruits gamma-

tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell* 118:323-335.

Sakurai A, Okamoto K, Fujita Y, Nakazato Y, Wakabayashi K, Takahashi H, Gonatas NK (2000) Fragmentation of the Golgi apparatus of the ballooned neurons in patients with corticobasal degeneration and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 100:270-274.

Sakurai A, Okamoto K, Yaguchi M, Fujita Y, Mizuno Y, Nakazato Y, Gonatas NK (2002) Pathology of the inferior olivary nucleus in patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 103:550-554.

Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, et al. (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917-18922.

Siddhanta A, Radulescu A, Stankewich MC, Morrow JS, Shields D (2003) Fragmentation of the Golgi apparatus. A role for beta III spectrin and synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 278:1957-1965.

Sobue K, Agarwal-Mawal A, Li W, Sun W, Miura Y, Paudel HK (2000) Interaction of neuronal Cdc2-like protein kinase with microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* 275:16673-16680.

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155:2153-2165.

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-1063.

Stankewich MC, Tse WT, Peters LL, Ch'ng Y, John KM, Stabach PR, Devarajan P, Morrow JS, Lux SE (1998) A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14158-14163.

Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Dityatev A, Schachner M (2004) Trans-Golgi network delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *J Cell Sci* 117:381-388.

Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9637-9641.

Tanemura K, Akagi T, Murayama M, Kikuchi N, Murayama O, Hashikawa T, Yoshiike Y, Park JM, Matsuda K, Nakao S, Sun X, Sato S, Yamaguchi H, Takashima A (2001) Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis* 8:1036-1045.

Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A (2002) Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13896-13901.

Thorpe JR, Morley SJ, Rulten SL (2001) Utilizing the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase pin1 as a probe of its phosphorylated target proteins. Examples of binding to nuclear proteins in a human kidney cell line and to tau in Alzheimer's diseased brain. *J Histochem Cytochem* 49:97-108.

Thyberg J, Moskalewski S (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 246:263-279.

Tomita S, Kirino Y, Suzuki T (1998) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J Biol Chem* 273:6277-6284.

Trojanowski JQ, Lee VM (1995) Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J* 9:1570-1576.

Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, Jr., Chae T, Harlow E (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371:419-423.

van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 83:1-45.

Verbeek MM, Otte-Holler I, van den Born J, van den Heuvel LP, David G, Wesseling P, de Waal RM (1999) Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 155:2115-2125.

von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5129-5134.

Walenta JH, Didier AJ, Liu X, Kramer H (2001) The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J Cell Biol* 152:923-934.

Wang X, An S, Wu JM (1996) Specific processing of native and phosphorylated tau protein by proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 219:591-597.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862.

Wilson DM, Binder LI (1997) Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150:2181-2195.

Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4884-4888.

Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293:711-714.

Xia W, Zhang J, Ostaszewski BL, Kimberly WT, Seubert P, Koo EH, Shen J, Selkoe DJ (1998) Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* 37:16465-16471.

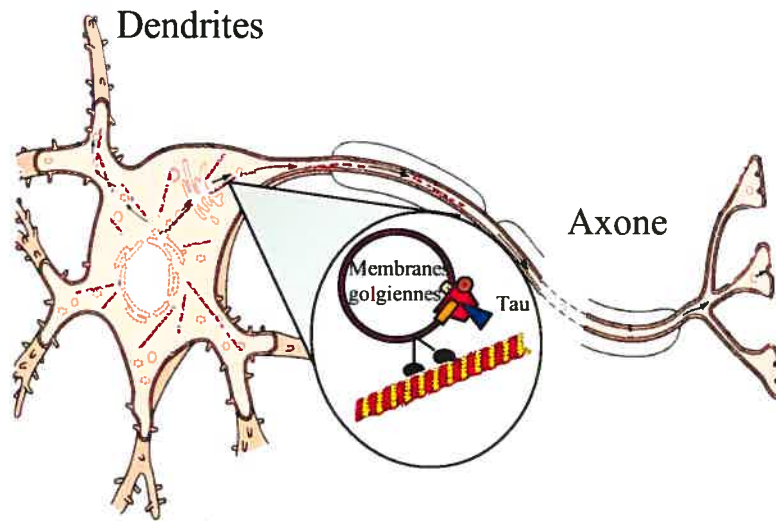
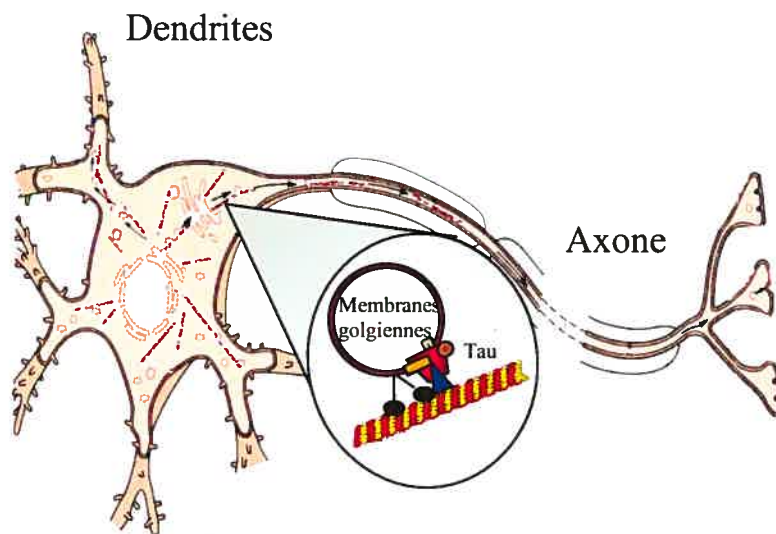
Xu H, Sweeney D, Wang R, Thinakaran G, Lo AC, Sisodia SS, Greengard P, Gandy S (1997) Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3748-3752.

Yoshiyama Y, Zhang B, Bruce J, Trojanowski JQ, Lee VM (2003) Reduction of detyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. *J Neurosci* 23:10662-10671.

Figures et légendes

Figure 1 Modèle de l'interaction tau-golgi.

Modélisation représentant l'association de tau aux vésicules golgiennes. L'interaction de tau avec les membranes golgiennes contribuerait à la ségrégation des vésicules vers le compartiment axonal. A) La protéine tau pourrait être une « étiquette » assurant que les vésicules soient reconnues et dirigées vers l'axone. B) La protéine tau pourrait également faire le pont entre les microtubules et les vésicules golgiennes, afin d'ancrer ces dernières.

Figure 1A**Figure 1B**

Annexe

Contribution personnelle

Lors de ce travail, j'ai participé personnellement à l'élaboration et à la mise en œuvre du projet. En effet, impliqué dès le début dans le processus de réflexion, j'ai par la suite tenté de répondre aux hypothèses que nous avons élaborées. Avec l'aide de Carole Abi Farah, j'ai complété l'analyse du fractionnement subcellulaire chez le rat adulte, puis mis au point la technique de co-immunoprécipitation afin de démontrer que la protéine tau était bien présente sur les vésicules golgiennes. J'ai également réalisé une grande partie des expériences de microscopie confocale sur les neurones en culture et sur les coupes de moelle épinière. Par suite de commentaires reçus au congrès de « Cell Biology » à San Francisco en décembre 2003, j'ai mis les techniques d'immunocytochimie de tau en microscopie électronique afin de montrer de façon plus convaincante que la protéine tau était associée à l'appareil de Golgi dans les motoneurones de la moelle. De plus, j'ai quantifié la distribution et la densité du marquage à l'or de la protéine grâce à un système d'analyse d'image dont j'ai su optimiser les paramètres. Finalement, j'ai contribué à la diffusion de ces travaux en présentant les résultats dans de nombreux congrès et séminaires. Plus récemment, j'ai recueilli et analysé les données présentées dans l'article soumis au Journal of Neurochemistry et participé à la rédaction de cet article.